Développement d'un système microfluidique de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires

Marie Gaillard

▶ **To cite this version:**

Marie Gaillard. Développement d'un système microfluidique de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV002 . tel-03675190

HAL Id: tel-03675190

https://theses.hal.science/tel-03675190

Submitted on 23 May 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Marie GAILLARD

Thèse dirigée par **Yoann ROUPIOZ**, Directeur de Recherche, CNRS
et codirigée par **Aurélie THUAIRE**, Ingénieur Chercheur, CEA Grenoble
préparée au sein du **Laboratoire Systèmes Moléculaires et Nano Matériaux pour l'Énergie et la Santé**
ainsi que du **CEA Leti,**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Développement d'un système microfluidique de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires

Development of a size-sorting and biomarker-specific microfluidic system for the analysis of extracellular vesicles

Thèse soutenue publiquement le **1 février 2022**,
devant le jury composé de :

Madame Myriam TAVERNA
Professeur des Universités, Université Paris Saclay, Rapporteur
Monsieur Wilfrid BOIREAU
Directeur de Recherche, CNRS, Rapporteur, Président du jury
Madame Virginie FAURE
Maître de Conférence, Université Grenoble Alpes, Examinatrice
Madame Elodie SOLLIER
Ingénieur Docteur, Benkei, Examinatrice
Monsieur Yoann ROUPIOZ
Directeur de Recherche, CNRS, Directeur de thèse
Madame Aurélie THUAIRE
Ingénieur Chercheur, CEA Grenoble, Co-encadrante de thèse, Invitée
Monsieur Pascal COLOSETTI
Ingénieur de Recherche, INSERM, Invité

Remerciements

Pour commencer ce manuscrit, je souhaiterais remercier tous ceux qui ont fait partie de l'aventure ces trois dernières années. J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont évalué mon travail de thèse : Madame Myriam Taverna et Monsieur Wilfrid Boireau, rapporteurs de ce travail pour votre lecture attentive, vos remarques éclairées et nos discussions passionnantes, Mesdames Virginie Faure et Elodie Sollier pour l'intérêt que vous avez porté à ce projet, et enfin Pascal Colosetti pour les discussions fructueuses, les conseils avisés, tout le soutien et l'amitié que tu m'as apportés durant ces trois années.

Je tiens à remercier infiniment mon directeur de thèse Yoann Roupioz et mon encadrante Aurélie Thuaire de m'avoir offert la possibilité de rejoindre le projet, de m'avoir ensuite guidée, accompagnée et soutenue avec bienveillance. Vos expertises complémentaires m'ont permis de mener à bien ce beau projet pluridisciplinaire. Je vous remercie de m'avoir transmis vos connaissances et nombreuses idées dans le monde de la DLD, des aptamères et des vésicules extracellulaires, ainsi que vos visions de scientifiques passionnés. Merci pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées, sans jamais être loin. Je suis conscience de la chance que j'ai eu de conduire ce projet de thèse à vos côtés. Pour tout cela, je vous remercie sincèrement.

Un grand merci également à Guillaume Nonglaton, Myriam Cubizolles, Arnaud Buhot et Vincent Agache pour avoir suivi cette thèse avec beaucoup d'intérêt et pour vos conseils avisés qui m'ont permis d'appréhender les difficultés avec plus de sérénité. Merci à Théo et Lena pour vos contributions à ce projet. Lena, ton travail acharné a permis de concrétiser une des plus belles manips de ce manuscrit, merci.

Je tiens à adresser un immense merci à Christine Chatellard pour son accueil toujours bienveillant au NTA. À l'équipe Cytomorpholab (Jérémie, Christophe et Magali), merci pour la location permanente de l'ultracentrifugeuse. Merci également à Éric Gautier et François Saint-Antonin pour votre expertise en microscopie électronique.

Je tiens à remercier mes deux super équipes officielles : le LSMB et le CREAB, mais aussi le L2CB. Un grand merci à Fabrice Navarro et Séverine Vignoud pour leur accueil chaleureux au sein du DTBS et pour avoir veillé au bon déroulement du projet.

J'adresse mes remerciements à ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler : Caro, François, Nico S., Catherine, Charly, et plus largement à mes co-paillasses : Patricia, Mathilde M., Bastien, Matéi, Clément, Nathalie D. Je tiens à remercier également mon super co-bureau : Fred B. pour son expertise en cookies dans les moments difficiles et sa bonne humeur à toute épreuve. Merci aussi à mes compagnons de Bastille : Charlotte, Camille, Mélissa, Yves, Thomas … et bien plus, Emilie, Paul, Anne-Carey et Séverine.

Certains collègues de labo deviennent parfois des amis très chers. Une pensée pour Sophie, Marine, Eric, Lucile et Charlotte avec qui les apéros au labo se sont transformés en chouettes soirées. Un immense merci à la *team* biomade : Christine (mille mercis pour ton soutien sans faille), PH, Martial et Didier. Vous êtes bien plus que de simples collègues. Un grand merci aussi à la *team* montagne du LSMB : Adrien (tu resteras mon encyclopédie de la biologie à vie !!!), Louis et Mathilde A.

Je tiens à remercier également mes amis, Guillaume pour les cafés à l'IBS, Enzo et Damien en souvenir de nos belles années de fac, Mégane et Lucie pour avoir été présentes durant mes recherches de bourse de thèse. Un immense merci à Anouchka, tu as été une très chouette collègue, une copine de Bastille (très)

matinale, motivée, même par tous les temps, et une amie sincère. Merci infiniment à Maud pour ton soutien au labo, les sorties ski de rando et cascade de glace à 48 heures de ma soutenance et ta précieuse amitié.

Elise, tu as été la meilleure binôme de thèse possible, présente aussi bien dans les moments de réussite que d'échec à toute heure du jour et de la nuit. Ce projet de thèse n'aurait jamais été le même si nos routes ne s'étaient pas croisées à l'automne 2018. Merci pour les *bitchy tea*, les repas du mardi soir, les séances de yoga, tes compétences de *cameraman*, les virées montagnardes … et bientôt montpelliéraines. Ta grande amitié m'est très chère.

Je remercie infiniment ma famille et particulièrement mes parents pour leur amour et leur soutien inconditionnels. Si j'en suis là, c'est grâce à vous deux ! Une pensée pour Romain C., véritable encyclopédie vivante, qui fait presque partie de la famille. Merci à Pauline pour tous les runs matinaux « thèse thérapie » et pour m'avoir poussé à écrire ma revue en première année, tu as certainement sauvé mon chapitre 1.

Pour terminer, je voudrais remercier Grégoire, pour le compagnon de cordée que tu as été depuis le début de cette thèse, et bien plus désormais. Ton soutien indéfectible à chaque sommet trop dur, à chaque manip qui plante, à chaque moment de vie est précieux. Merci pour tes encouragements constants lors de l'écriture de ce manuscrit. J'ai adoré vivre cette aventure avec toi et j'ai hâte de vivre toutes les prochaines à tes côtés.

Table des matières

Liste des abréviations 11

Introduction 15

Chapitre 1 : Vésicules extracellulaires, de nouveaux biomarqueurs diagnostiques prometteurs 17

Partie 1 : Vésicules extracellulaires, de nouvelles sources d'informations sur la santé humaine ? 18

1. Les vésicules extracellulaires 18

1.a. Description des vésicules extracellulaires et de leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques 19

1.a.i. Description des vésicules extracellulaires 19

1.a.ii. Mécanismes de communication et fonctions physiologiques 23

1.b. Des biomarqueurs prometteurs 27

1.b.i. Importance de la biopsie liquide pour le diagnostic médical 27

1.b.ii. Cancers 27

1.b.iii. Maladies neurodégénératives 29

1.b.iv. Maladies infectieuses 30

1.b.v. Maladies chroniques 30

1.b.vi. Utilisation thérapeutique : vers la bioproduction des vésicules extracellulaires 30

1.c. Défis actuels autour de la recherche des Vésicules Extracellulaires 31

2. Méthodes d'isolement et de caractérisation des vésicules extracellulaires 32

2.a. État de l'art des méthodes standard d'isolement 32

2.a.i. Centrifugation différentielle 32

2.a.ii. Gradient de densité 33

2.a.iii. Chromatographie d'exclusion stérique 34

2.a.iv. Précipitation par agents polymères 34

2.b. État de l'art des méthodes de caractérisation 36

2.b.i. Caractérisations physiques : taille, masse et concentration 36

2.b.i.1. Analyse du suivi de nanoparticules (NTA) 36

2.b.i.2. *Tunable Resistive Pulse Sensing* (TRPS) 37

2.b.i.3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) 38

2.b.i.4. Microscopie électronique (ME) 38

2.b.i.5. Microscopie à force atomique (AFM) 39

2.b.i.6. Émergence de capteurs de masse microfluidiques : résonateurs SMR/SNR 39

2.b.ii. Caractérisations biochimiques 41

2.b.ii.1. Quels biomarqueurs pour cibler les vésicules extracellulaires ? 41
2.b.ii.2. *Western blot* (WB) 43
2.b.ii.3. L'ELISA 44
2.b.ii.4. Cytométrie en flux (FACS) 44
2.b.ii.5. Analyses moléculaires : séquencage ADN/ARN 46
2.b.iii. Biocapteurs pour la détection de vésicules extracellulaires 46
2.c. Les limites des méthodes actuelles d'isolement, de caractérisation et de détection 49
Partie 2 : La microfluidique pour la préparation d'échantillons biologiques : vers l'utilisation du principe de déplacement latéral déterministe de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique 51
1. Émergence des méthodes microfluidiques pour l'isolement de vésicules extracellulaires 51
2. Principe du Déplacement Latéral Déterministe (DLD) 52
2.a. Principe de séparation 52
2.b. Choix du *design* 54
2.b.i. Diamètre de coupure 54
2.b.ii. Exemples de designs de DLD 54
2.c. Défis liés à la conception de systèmes microfluidiques DLD 55
2.c.i. Limiter le bouchage 55
2.c.ii. Séparer des objets biologiques non sphériques 56
2.c.iii. Combiner les systèmes DLD avec d'autres forces physiques 56
3. Applications : Le tri de particules biologiques micrométriques … 57
3.a. Cellules sanguines 57
3.b. Cellules Tumorales Circulantes 57
3.c. Bactéries 58
4. Applications : les défis du tri de particules biologiques nanométriques 58
4.a. Vésicules extracellulaires 58
4.b. Virus 58
4.c. Protéines 59
Partie 3 : Définition du projet de thèse 60
Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de vésicules extracellulaires pour la validation de méthodes alternatives 65
1. Choix d'une méthode d'isolement des vésicules extracellulaires 67
1.a. Culture cellulaire de lignées modèles en vue de l'isolement de vésicules extracellulaires 67
1.b. Centrifugation différentielle 68
1.c. Chromatographie d'exclusion stérique 68

1.d. Comparaison du profil d'EVs issues de cellules THP-1 obtenues par différentes méthodes d'isolement 68
2. Caractérisations physiques 70
2.a. Évaluation des instruments de caractérisation d'objets de taille nanométrique 70
2.b. Distribution en taille et en concentration : le système NTA 74
2.b.i. Calibration du NTA à l'aide de nanoparticules de silice 74
2.b.ii. Analyse de suivi de nanoparticules de différents types de vésicules extracellulaires 78
2.b.iii. Évaluation de l'impact des méthodes de conservation/stockage d'échantillons de vésicules extracellulaires sur leur profil de taille 79
2.c. Cryo-microscopie électronique 81
3. Caractérisations biochimiques 83
3.a. Caractérisation protéique de l'échantillon de vésicules extracellulaires par *western blot* 83
3.b. Caractérisation des protéines membranaires des vésicules extracellulaires : utilisation d'un kit commercial de test ELISA 85
3.c. Développement d'un test immunologique ELISA direct de détection des protéines membranaires des vésicules extracellulaires 87
3.d. Développement d'un test immunologique ELISA *sandwich* de détection des protéines membranaires des vésicules extracellulaires 89
4. Conclusions 92
Chapitre 3 : Validation des sondes aptamères pour la capture de vésicules extracellulaires 95
1. Les aptamères : de nouvelles sondes pour le diagnostic 96
1.a. Inconvénients des sondes anticorps 96
1.b. Sondes aptamères 96
1.b.i. Définition et structure 96
1.b.ii. Méthode de sélection : le SELEX 97
1.b.iii. Propriétés 99
1.c. Applications 101
1.c.i. Régulation de l'expression génique 101
1.c.ii. Utilisation dans le monde des biocapteurs : l'exemple des aptasensors à vésicules extracellulaires 101
1.c.iii. Émergence de méthodes d'isolement de vésicules extracellulaires par aptamères 103
2. *Design* de sondes aptamères pour une capture efficace et un relargage contrôlé 104
3. Validation de la performance des sondes aptamères immobilisées pour la capture et la caractérisation de vésicules extracellulaires en vue de leur relargage contrôlé 107
3.a. Développement d'un test ELASA pour la capture de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 107

3.b. Évaluation de la stabilité temporelle de vésicules extracellulaires par test ELASA 110

3.c. Évaluation de la limite de détection de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 dans un échantillon biologique complexe par test ELASA 111

4. Conclusions et Perspectives 113

Chapitre 4 : Mise au point d'une méthode de tri microfluidique en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires supportées par des billes micrométriques 115

1. Association de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires 116

2. Mise au point d'un système DLD micro-ciblé 117

2.a. *Design* des composants DLD en silicium 117

2.b. Fabrication en salle blanche des composants DLD et intégration fluidique 121

2.c. Banc expérimental DLD micro-ciblé 124

3. Validation du tri en taille du système DLD pour des particules micrométriques 125

4. Fonctionnalisation de billes micrométriques par des sondes aptamères 127

4.a. Greffage de séquences aptamères sur les billes micrométriques 127

4.b. Anticipation du relargage des vésicules extracellulaires par le déplacement de brins d'oligonucléotides ADN 129

5. Capture supportée biomarqueur-spécifique de vésicules extracellulaires par le système DLD micro-ciblé 133

5.a. Capture de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 dans un milieu biologique complexe en ciblant la protéine CD63 133

5.b. Capture de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 dans un milieu biologique complexe en ciblant la protéine EpCAM 135

6. Isolement biomarqueur-spécifique de vésicules extracellulaires par relargage contrôlé 137

6.a. Caractérisation de la distribution en taille des sous-populations de vésicules extracellulaires exprimant le marqueur CD63 138

6.b. Caractérisation de la distribution en taille des sous-populations de vésicules extracellulaires exprimant le marqueur EpCAM 140

7. Conclusions et Perspectives 142

Chapitre 5 : Développement d'un système de tri microfluidique par DLD pour l'isolement de particules sub-micrométriques 145

1. De la conception d'un système DLD micro-ciblé vers un système DLD nano-ciblé : les défis techniques à relever 146

2. Développement de systèmes DLD nano-ciblés 147

2.a. *Design* de composants DLD en silicium 147

2.b. Fabrication en salle blanche des composants DLD en silicium 151

2.c. Intégration fluidique : développement de carte fluidique haute pression 152

2.d. Banc expérimental DLD nano-ciblé 153
3. Le système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm pour le tri d'échantillon biologique complexe 154
3.a. Utilisation du dispositif analytique DLD nano-ciblé D_c = 350 nm 154
3.b. Calibration du système de tri par des particules modèles 155
3.b.i. Billes modèles 155
3.b.ii. Modèles biologiques simples 157
3.c. Isolement de vésicules extracellulaires 161
3.c.i. Vésicules extracellulaires issues de cellules THP-1 : lignée modèle 161
3.c.ii. Vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 : généralisation de l'isolement de vésicules extracellulaires à partir de milieu de culture cellulaire 165
3.c.iii. Isolement de vésicules extracellulaires issues de plasma sanguin, un échantillon biologique complexe 167
4. Le système DLD nano-ciblé D_c = 140 nm : vers le fractionnement de sous-populations de vésicules extracellulaires 168
4.a. Dispositif analytique DLD nano-ciblé D_c = 140 nm 168
4.b. Calibration du système de fractionnement par des particules modèles 169
4.b.i. Billes modèles 169
4.b.ii. Fractionnement de sous-populations de vésicules extracellulaires 171
5. Développement d'un système DLD automatisé 172
6. Conclusions et Perspectives 173
Chapitre 6 : Intégration d'aptamères dans le système DLD appliquée à l'isolement de vésicules extracellulaires d'intérêt 177
1. Différentes méthodes de silanisation 178
1.a. Hydroxylation 179
1.b. Méthode standard de silanisation du silicium en phase liquide 179
1.c. Phase vapeur 180
1.d. Phase supercritique 181
2. Fonctionnalisation en phase liquide pour le greffage d'oligonucléotides ADN sur substrats en silicium 184
2.a. Stratégie chimique par l'APTES en phase liquide pour la fonctionnalisation de substrats en silicium plans 184
2.b. Stratégie chimique par le carboxyéthylsilanetriol en phase liquide pour la fonctionnalisation de composants DLD 190
2.c. Limites de l'approche en phase liquide 191
3. Méthodes alternatives : fonctionnalisation en phases vapeur et supercritique pour le greffage d'oligonucléotides ADN sur substrats en silicium plans et microstructurés 192

3.a. Recours aux méthodes de fonctionnalisation en phases vapeur et supercritique 192

3.b. Évaluation comparée de différentes méthodes de fonctionnalisation pour le greffage d'oligonucléotides ADN : fonctionnalisation de substrats silicium plans et microstructurées 192

3.c. Greffage d'oligonucléotides ADN dans les composants DLD en phases vapeur et CO_2 supercritique 196

4. Développement d'une stratégie de fonctionnalisation photoactivable en vue du multiplexage d'aptamères dans les composants DLD 198

4.a. Synthèse chimique du triméthoxysilane photoactivable 198

4.b. Fonctionnalisation de substrats silicium plans par la stratégie de silane photoactivable en phase liquide pour le greffage localisé d'aptamères 201

4.c. Fonctionnalisation en phase vapeur de composants DLD pour le greffage localisé d'aptamères en vue du développement d'un système multiplexe 207

5. Intégration d'aptamères dans le système de tri DLD : capture et relargage contrôlé de vésicules extracellulaires $EpCAM^+$ 209

6. Conclusions et Perspectives 212

Conclusions et Perspectives 215

Bibliographie 221

Annexes 247

Liste des publications 255

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Alix	*ALG-2 interacting protein X*
AF4	*Asymmetric Flow Field Flow Fractionation* (Fractionnement asymétrique du champ de flux)
AFM	*Atomic Force Microscopy* (Microscopie à force atomique)
AR	*Aspect Ratio* (Ratio d'aspect)
ARF	*ADP-Ribosylation Factor* (Facteur de ribosylation de l'ADP)
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
BSA	*Bovine Serum Albumin* (Albumine de sérum bovin)
CCD	*Charge-Coupled Device* (Dispositif à couplage de charges)
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Corps MultiVésiculaires
COC	Copolymère d'Oléfine Cyclique
CO_2SC	CO_2 SuperCritique
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CTCs	Cellules Tumorales Circulantes
Cy3 – Cy5	Cyanine 3 – Cyanine 5
D_c	Diamètre critique
DLD	Déplacement Latéral Déterministe
DLS	*Dynamic Light Scattering*
E. coli	*Escherichia coli*

EDC	Chlorure d'1-éthyl-3-(-3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EFS	Établissement Français du Sang
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
ELISA	*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Dosage d'immunoabsorption enzymatique)
ELLSA	*Enzyme-Linked Lectin-Specific Assay* (Dosage d'aptaméro-absorption enzymatique)
EpCAM	*Epithelial Cell Adhesion Molecule*
ESCRT	*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*
EVs	*Extracellular Vesicles* (Vésicules extracellulaires)
FACS	*Fluorescence-Activated Cell Sorting* (Cytométrie en flux assistée par fluorescence)
FBS	*Fetal Bovine Serum* (Sérum fœtal de veau)
FAM/FITC	*Fluorescein IsoThioCyanate* (Isothiocyanate de fluorescéine)
HF	*Hydrogen fluoride* (Fluorure d'hydrogène)
HSP	*Heat Shock Proteins*
HRP	*HorseRadish Peroxydase* (Peroxydase de raifort)
ICAM-1	*InterCellular Adhesion Molecule 1*
IgG	Immunoglobulines G
ISEV	*International Society for Extracellular Vesicles*
LAMP	*Lysosome-Associated Membrane Protein* (Protéine Membranaire Associée au Lysosome)
LB	*Luria Bertani*
LOD	*Limit of Detection* (Limite de Détection)
ME	Microscopie Électronique
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
MEM	*Minimum Essential Medium*
miARN	micro Acide RiboNucléique

MUC1	Mucin-1
MSC	*Mesenchymal Stem Cells* (Cellules souches mésenchymateuses)
MV	Microvésicules
NPPOC	3'-Nitrophenylpropyloxycarbonyl
NTA	*Nanoparticle Tracking Analysis*
NPs	Nanoparticules
PBS	*Phosphate Buffer Saline* (Tampon phosphate salin)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	Phycoérythrine
POC	*Point-Of-Care* (Au chevet du patient)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
ppm	Partie par million
PSA	*Prostate-specific antigen* (Antigène spécifique de la prostate)
RAB	Protéine liée au RAS dans le cerveau
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT-PCR	*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (Amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse)
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodécylsulfate de sodium)
SEC	*Size Chromatography Exclusion* (Chromatographie d'Exclusion Stérique)
SELEX	*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment* (Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel)
Si	Silicium (Élement chimique)
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide)
SNR/SMR	*Suspended Nano/Microchannel Resonators* (Nano/Micro canaux résonants suspendus)

u.a.	Unités arbitraires
UC	Ultracentrifugation
UV	Ultra-Violet
TEM	*Transmision Electronic Microscopy* (Microscopie électronique à transmission)
TfR	Récepteur à la Transferrine
TRPS	*Tunable Resistive Pulse Sensing*
WB	*Western blot*
XPS	*X-ray photoelectrons spectroscopy* (Spectrométrie photoélectronique X)

Introduction

Les vésicules extracellulaires (EVs) constituent un moyen important de communication intercellulaire. Ces vésicules lipidiques, sécrétées physiologiquement par les cellules, présentent une grande hétérogénéité aussi bien en taille qu'en contenu protéique. Présentes en quantité considérable dans les liquides biologiques tels que le sang ou l'urine, les EVs font l'objet d'un intérêt grandissant depuis une vingtaine d'années notamment pour des applications diagnostiques. En effet, leurs modes de sécrétion (endocytose ou exocytose) permettent aux EVs de disposer de protéines issues des cellules émettrices et d'être ainsi considérées comme un reflet de l'état cellulaire parental[1]. Ainsi, les EVs ouvrent de nouvelles possibilités de biopsie liquide non invasive. Plusieurs caractéristiques en font des biomarqueurs particulièrement intéressants en diagnostic clinique notamment leur concentration élevée dans les fluides biologiques en comparaison avec les cellules tumorales circulantes (de l'ordre d'un facteur 10^{10}), leur universalité puisqu'elles sont sécrétées par l'ensemble des types cellulaires et leur stabilité, contrairement aux autres biomarqueurs solubles de type ARN par exemple[2].

Cependant, une des principales difficultés liée à l'utilisation des EVs comme biomarqueurs en clinique est l'absence de méthodes standard d'isolement à partir d'échantillon biologique complexe. Extraire des EVs intègres est un défi important pour les analyses subséquentes. Les techniques d'isolement actuelles, ultracentrifugation ou chromatographie d'exclusion stérique notamment, ne permettent pas d'assurer des performances adaptées à l'utilisation clinique en termes de pureté, d'efficacité, de coût … Face à cette limite, des chercheurs de tous horizons réunis par l'*International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) appellent la communauté scientifique au développement de méthodes d'isolement et de caractérisation reproductibles et standardisées des EVs[3].

Dans ce contexte, les systèmes microfluidiques apparaissent particulièrement intéressants pour l'amélioration des performances d'isolement des EVs notamment grâce, entre autres, à la réduction du coût et des volumes d'échantillons nécessaires. La microfluidique ouvre aussi de nouvelles possibilités pour les systèmes *Point-of-Care* (POC) en apportant davantage de miniaturisation, d'automatisation et de portabilité. C'est pourquoi, depuis une dizaine d'années, de nombreuses techniques d'isolement et de détection d'EVs ont été développées grâce à des systèmes microfluidiques *Lab-on-Chip* pour tenter d'apporter une méthode répondant aux exigences liées aux EVs[4]. Ces méthodes sont généralement basées sur deux critères distincts : la taille ou la présence d'un biomarqueur membranaire. Cependant, les EVs ne peuvent pas uniquement se définir par l'un ou l'autre de ces critères. Ainsi, la combinaison de ces deux caractéristiques en un unique système microfluidique permettrait d'apporter une nouvelle solution d'analyse d'EVs, potentiellement reproductible et standardisable.

L'association de tri en taille et de tri biomarqueur-spécifique sera envisagée par le couplage de la technique de Déplacement Latéral Déterministe (DLD) avec l'utilisation d'aptamères. Le système DLD présente l'avantage de préserver l'intégrité de l'échantillon biologique par une séparation en taille passive. Un réseau de piliers micrométriques de géométrie définie dévie les particules de l'échantillon en fonction de leur taille dans le canal microfluidique. Cette technologie est particulièrement adaptable grâce à la versatilité de la géométrie du réseau de piliers en fonction de la taille des particules d'intérêt. L'isolement d'EVs par DLD a déjà été démontré mais nécessite un nombre d'étapes de pré-purification considérable[5].

En parallèle, cibler les sous-populations d'EVs en fonction des protéines exprimées à leur surface apparaît comme une stratégie permettant d'isoler uniquement les EVs d'intérêt diagnostique parmi l'ensemble des EVs[6]. Les aptamères, oligonucléotides ayant une certaine affinité pour une cible donnée, sont des sondes alternatives aux anticorps offrant des avantages indéniables en termes de facilité de production, d'intégration, de spécificité … La possibilité d'une capture spécifique des cibles, suivie d'un relargage contrôlé par ajout des brins complémentaires aux aptamères, rend ces sondes particulièrement attrayantes pour le développement d'un système d'isolement spécifique d'EVs.

C'est pour cela que deux laboratoires : le CEA Leti et le SyMMES CREAB ont décidé d'associer leurs expertises en proposant le développement d'un système microfluidique DLD biomarqueur-spécifique pour l'analyse d'EVs comme sujet de thèse en 2018. Ce projet a été soutenu financièrement par le Labex ARCANE.

Ce manuscrit s'organise en six chapitres. Le premier chapitre présente un état de l'art sur les vésicules extracellulaires, leurs méthodes d'isolement et de caractérisation et les limites associées. Les atouts de la microfluidique et notamment des systèmes DLD seront présentés. Les objectifs de la thèse seront détaillés à la fin de ce chapitre. Le deuxième chapitre présente les différentes méthodes standard d'isolement et de caractérisation des EVs afin de saisir les enjeux liés au développement d'une méthode alternative. Le troisième chapitre s'attarde sur la validation des sondes aptamères pour la capture d'EVs d'intérêt. La mise au point d'une méthode de tri microfluidique biomarqueur-spécifique pour l'isolement d'EVs supportées par des billes micrométriques est abordée dans le quatrième chapitre. Le cinquième chapitre présente le développement d'un système de tri microfluidique par DLD pour l'isolement de particules nanométriques telles que les EVs. Finalement, le sixième chapitre expose l'intégration d'aptamères dans le système de tri DLD appliqué aux EVs par le développement de stratégies de chimie de surface. Finalement, ces six chapitres ont permis de lever un certain nombre de verrous et permettent désormais d'envisager de nouvelles perspectives de recherche afin de s'approcher de l'utilisation clinique de ces objets biologiques.

Chapitre 1 : Vésicules extracellulaires, de nouveaux biomarqueurs diagnostiques prometteurs

Etat de l'art – Les vésicules extracellulaires : de nouveaux biomarqueurs

- Dans ce chapitre, les vésicules extracellulaires (EVs), leurs structures et leurs fonctions seront présentées. Suite à cela, leur rôle de biomarqueur sera abordé pour soulever leur très fort potentiel comme objets diagnostiques de différents types de pathologies (cancers, maladies infectieuses, chroniques …).

- De plus, les techniques classiques d'isolement puis de caractérisation physique et biochimique seront étudiées. Les limites liées à ces méthodes seront soulevées et des techniques émergentes, microfluidiques notamment, seront introduites.

- Face à la difficulté d'isolement des EVs, la microfluidique utilisée comme outil de préparation d'échantillon biologique est un domaine en plein essor. Nous approfondirons le monde du Déplacement Latéral Déterministe (DLD) et son potentiel de séparation pour des échantillons biologiques complexes. Enfin, nous regarderons comment appliquer ce principe aux échantillons de taille nanométrique tels que les EVs.

Partie 1 : Vésicules extracellulaires, de nouvelles sources d'informations sur la santé humaine ?

Dans cette première partie, les vésicules extracellulaires et leurs fonctions physiologiques seront décrites. À travers différents types de pathologies étudiées, les vésicules ont un rôle de biomarqueurs prometteurs qui sera illustré. Suite à cela, les différentes méthodes d'isolement et de caractérisation (physique et biochimique) des vésicules extracellulaires seront synthétisées afin de pointer les limites de ces méthodes actuelles pour l'usage des vésicules extracellulaires en tant d'objets biologiques de diagnostic.

1. Les vésicules extracellulaires

Dans les organismes pluricellulaires, la communication entre les cellules est assurée par différents modes : soit la communication directe soit par l'échange de molécules dans le milieu extracellulaire, telles que les protéines, les peptides, les lipides, les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines ou encore les nucléotides. Ces molécules sont sécrétées par une cellule émettrice et activent ensuite les voies de signalisation et les modifications liées à l'état physiologique de la cellule réceptrice. En complément, les cellules eucaryotes utilisent une troisième voie de communication par les vésicules extracellulaires (EVs). En effet, les petites molécules échangées peuvent être encapsulées dans des vésicules lipidiques qui sont libérées par les cellules dans leur environnement extracellulaire et circulent dans la plupart des fluides biologiques[7]. Ces EVs ont été largement étudiées au cours de la dernière décennie en raison de leurs fonctions à la fois physiologiques et pathologiques importantes. En 2011, l'*International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) a été créée. Elle est aujourd'hui composée de plus de 1 500 membres et se donne pour objectif principal d'encadrer et de standardiser la recherche sur les EVs. La *Figure 1.1* ci-dessous montre la croissance extrêmement rapide de la littérature dans ce domaine et l'intérêt de la communauté scientifique mondiale pour ces objets biologiques.

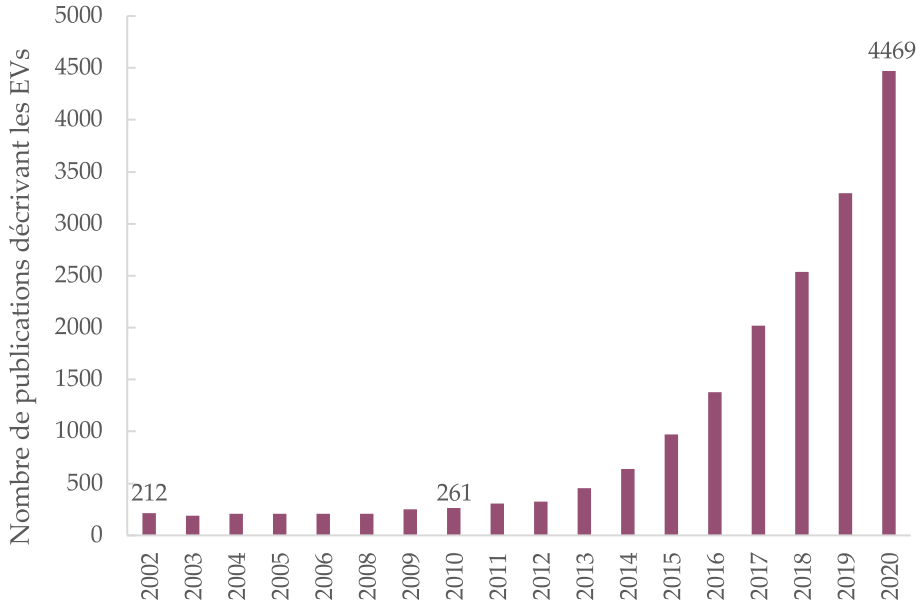


Figure 1.1: Évolution du nombre de publications sur la recherche mondiale des EVs depuis 2002, diagramme établi à partir des publications recensées part Web of Science à l'automne 2021.

La première observation des EVs remonte à 1946 comme le rapportent Chargaff et West[8], elles sont tout d'abord considérées comme des « poussières de thrombocytes » issues du processus d'apoptose[9]. En 1983, les prémices de la libération des EVs par les cellules sont décrites par Bin-Tao Pan et ses collaborateurs[10]. Ils rapportent la libération des EVs par les corps multivésiculaires (CMV) comme mécanisme d'élimination des protéines de la membrane plasmique au cours du processus de maturation des réticulocytes. Les immunologistes ont été les premiers à s'intéresser de près aux EVs en 1996 et ont prouvé que les EVs isolées des lymphocytes B présentent des antigènes spécifiques et induisent une réponse immunitaire[11]. Des EVs sont finalement découvertes dans tous les domaines de l'arbre phylogénétique : eucaryotes (protistes[12], fungi[13], plantes[14], animaux[8]) ; bactéries[15,16] ; archées[17] au début du XXIème siècle.

1.a. Description des vésicules extracellulaires et de leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques

1.a.i. Description des vésicules extracellulaires

Les EVs sont des nanoparticules sphériques à bicouche lipidique unilamelaire de taille hétérogène de 50 à 350 nm environ[1]. La membrane lipidique des EVs est enrichie en sphingolipides et contient des protéines membranaires. A l'intérieur, les EVs contiennent à la fois des protéines cytosoliques mais aussi des acides nucléiques tels que des ARN messagers (ARNm) et des micros ARN (miARN)[18] (*Figure 1.2*).

Parmi les différentes molécules biologiques transportées par les EVs, une composante très intéressante en termes d'informations est l'ARN fonctionnel, qui peut être traduit par les cellules réceptrices et ainsi modifier leur phénotype. Peu avant le début des années 2010, le transport des ARNm et des miARN des EVs a été démontré pour la première fois[19,20] comme utilisant les EVs. De plus, la traduction des ARNm encapsulés dans les cellules cibles a mis en évidence un transfert efficace de l'information génétique par les EVs[21,22]. En parallèle de l'ARN extra-vésiculaire, il a été démontré que certaines EVs transporteraient de courtes séquences non-codantes d'ADN[23–25] qui sont dépendantes de la voie de biogenèse des EVs et des *stimuli* cellulaires. Cependant, la présence d'ADN non-codant n'est pas communément adoptée et reste marginalement démontrée. L'engouement actuel pour les EVs comme biomarqueurs prometteurs permet des avancées considérables et la présence d'ADN sera certainement confirmée dans les prochaines années. D'autre part, la présence ou l'absence des protéines d'adhésion cellulaire comme les tétraspanines et d'autres protéines transmembranaires spécifiques à chaque type cellulaire sont des informations primordiales de plus en plus utilisées pour le diagnostic[26].

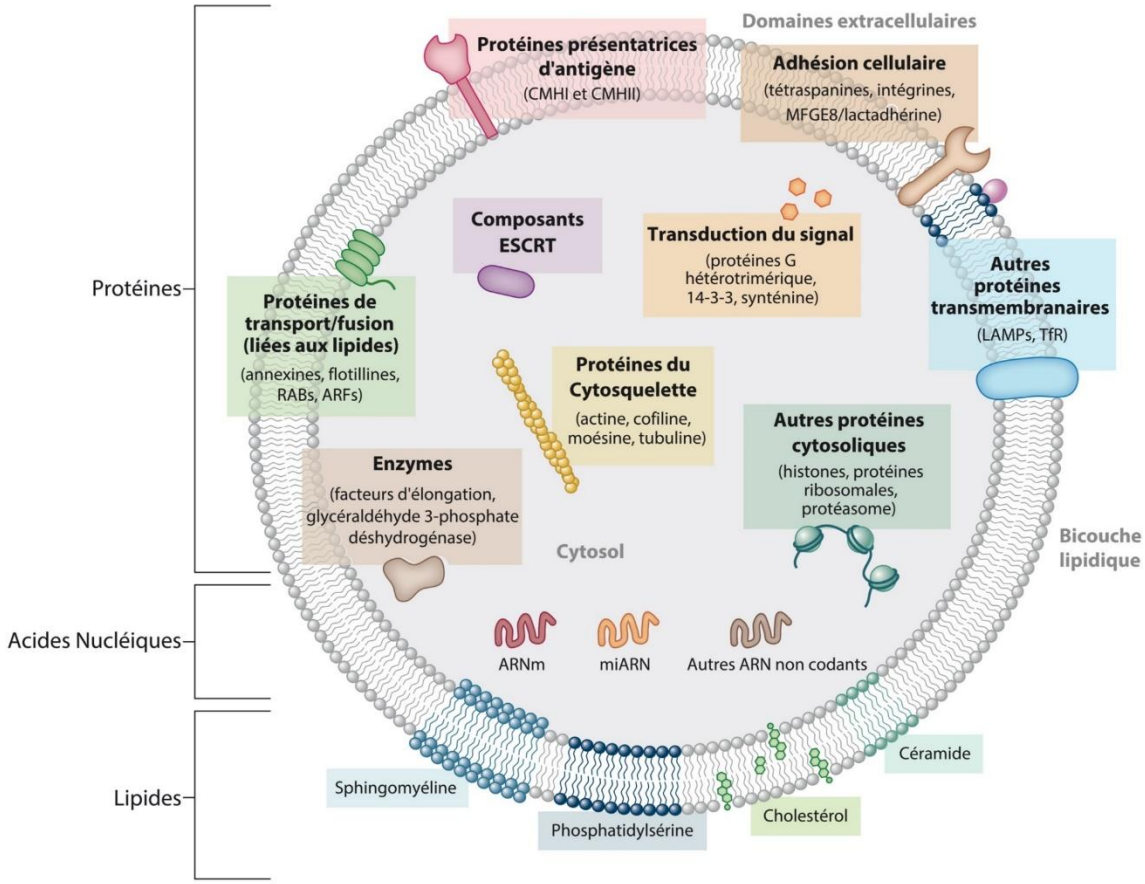


Figure 1.2 : Vue d'ensemble de la composition biochimique des EVs, adapté de Colombo et al.[27].

En ce qui concerne la membrane lipidique des EVs, sa composition influence sa rigidité et donc la formation, la fonction et la stabilité des vésicules[28]. Des concentrations plus élevées en sphingolipides et en lipides di-saturés (comme le cholestérol) ont été trouvées dans les membranes des EVs en comparaison aux concentrations de référence des membranes cellulaires[29,30]. Ainsi, celles-ci sont plus rigides, permettant aux EVs de présenter une certaine stabilité dans différents environnements extracellulaires, avec des applications très prometteuses pour l'utilisation comme nouveaux vecteurs de distribution de médicaments[31,32]. Les membranes des EVs présentent également une concentration plus élevée en phosphatidylsérine par rapport aux membranes cellulaires des cellules sécrétrices[33]. La concentration des EVs libérées dans le milieu extracellulaire dépend du type de cellule sécrétrice, de son état physiologique et des stimulations du microenvironnement extracellulaire[34]. Des stimulants tels que les états hypoxiques[35], l'acidité du microenvironnement[30] (*in vivo* et *in vitro*) et l'ajout de calcium ionophore[20] (*in vitro*) peuvent augmenter la concentration d'EVs libérées. Ces *stimuli* externes affectent non seulement le nombre d'EVs sécrétées, mais ils modifient aussi leur composition de manière non négligeable. D'autres conditions de microenvironnement extracellulaire modifient eux aussi la composition des EVs : signaux inflammatoires[36,37] et oncogéniques[38,39].

Les EVs peuvent être classées en trois grandes catégories en fonction de leur voie de biogénèse : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques.

La voie de libération de chaque sous-type d'EVs est représentée dans la *Figure 1.3* : les exosomes proviennent de l'exocytose des corps multivésiculaires (CMV) et mesurent entre 50 et 150 nm. Les exosomes sont donc formés par endocytose. Les microvésicules (MV) se forment par le bourgeonnement de la membrane plasmique et les corps apoptotiques sont eux générés lors de l'apoptose cellulaire pour éliminer les débris cellulaires. Les MV sont de grandes vésicules dont le diamètre est compris entre 100 et 800 nm. Les corps apoptotiques affichent des diamètres allant de 200 nm à 5 µm. Ils participent à l'encapsulation et à la l'élimination des débris cellulaires.

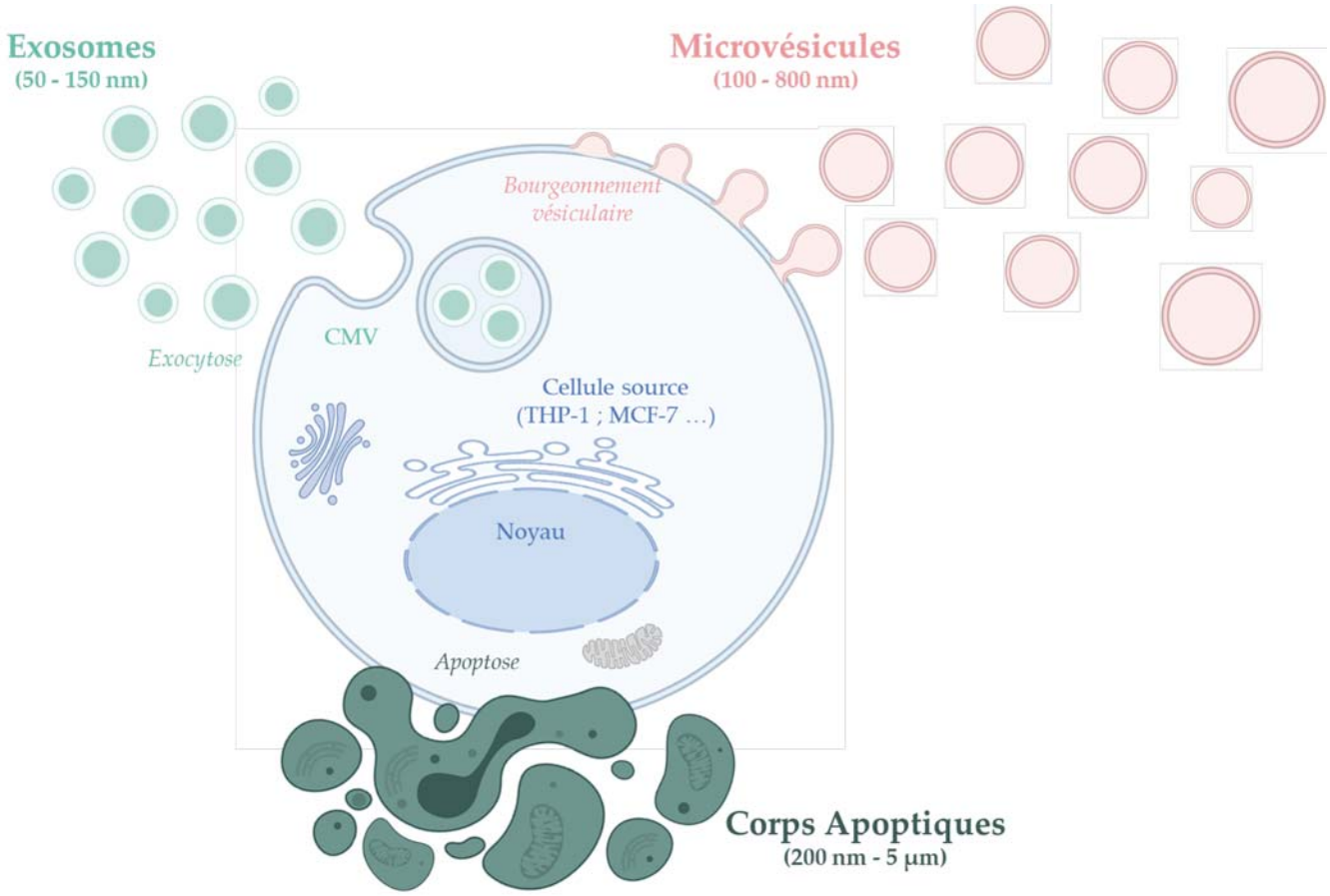


Figure 1.3 : Biogénèse des différentes populations d'EVs : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques.

Les caractéristiques de ces trois populations d'EVs sont résumées dans le *Tableau 1.1*. La classification des EVs comme suit a été choisi en accord avec ce qui fait référence lors de l'écriture de ce manuscrit.

Vésicules extracellulaires			
	Exosomes	Microvésicules	Corps Apoptotiques
Biogénèse	Fusion entre les corps multivésiculaires et la membrane plasmatique	Bourgeonnement à partir de la membrane plasmatique	Apoptose
Diamètres	50 – 150 nm	100 – 800 nm	200 nm – 5 μm
Accélération	100 000 g	10 000 g	2 000 g
Biomarqueurs	Protéines impliquées dans la formation des CMV (ALIX et TSG101), chaperonnes (Hsc70 et HSP90), molécules présentatrices (CMHI et CMHII) et tétraspanines (CD63, CD9 et CD81)	Intégrines, glycoprotéines, phosphoprotéines, sélectines, protéines de bourgeonnement membranaire (AARDC1 et TSG101), protéines de régulation du cytosquelette (ARF6), ligand CD40	Histones liés à l'ADN, phosphatidylsérine
Contenu biologique	ARN, ADN, protéines cytoplasmiques et membranaires	ARN, ADN, protéines cytoplasmiques et membranaires	Fractions nucléaires et organelles
Références	Théry *et al.* Current Protocols in Cell Biology, 2006	Heijnen *et al.* Blood, 1999	Théry *et al.* Journal of Immunology, 2001

Tableau 1.1 : Les différentes sous classes d'EVs et leurs caractéristiques, adapté de Théry et al.[40].

Plus précisement, les exosomes sont formés à partir des compartiments endosomaux internes des cellules, appelés CMV. En 1985, il a été démontré que les CMV peuvent suivre deux voies de dégradation, soit une voie de dégradation intracellulaire à travers les lysosomes, soit une voie de dégradation par fusion avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans l'environnement extracellulaire[41]. Le contenu des CMV correspond aux vésicules intraluminales. Lorsque ces vésicules sont libérées dans l'environnement extracellulaire, elles sont alors appelées "exosomes". Les exosomes véhiculent certains types de protéines spécifiques qui proviennent de la voie endocytaire et de la membrane plasmique, en tous points différentes des protéines des corps apoptotiques[42] comme décrit dans le tableau ci-dessus.

Des marqueurs protéiques classiques des exosomes ont été identifiés : les protéines impliquées dans la formation des CMV (ALIX et TSG101), chaperonnes (Hsc70 et HSP90), molécules présentatrices (CMHI et CMHII) et tétraspanines (CD63, CD9, CD81)[1,43,44]. Une étude protéomique menée sur différentes sous-populations d'EVs a montré des différences d'expressions de cinq protéines selon le sous-type d'EVs[45]. Ces marqueurs sont donc des éléments nécessaires mais pas suffisants pour démontrer la présence d'exosomes.

La taille des exosomes est déterminée par la dimension des vésicules internes des CMV où elles se sont formées, qui va de 50 à 150 nm. La densité des exosomes apparaît être de l'ordre de 1,13-1,19 g/mL mais reste variable en fonction de l'enrichissement en protéines intravésiculaires[46].

Au vu de la complexité des voies de différenciation des sous-types d'EVs, sont considérés comme exosomes, les particules disposant des caractéristiques suivantes :

- Afficher une population aux diamètres compris entre 50 et 150 nm avec une assymétrie de la distribution en taille caractéristique[47] (pic de population majoritaire autour d'environ 100 nm et sous-populations à environ 150, 200, 300 nm de diamètre).
- Présenter différentes protéines caractéristiques (ALIX, TSG101, CD9 et CD63 par exemple)
- Etre issues de la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique (présence de protéines plasmiques : tétraspanines par exemple).

Cependant, quelques mises en garde ont été faites récemment pas l'ISEV pointant notamment le fait que le diamètre des exosomes peut atteindre 250 nm et que d'autres types d'EVs peuvent exprimer des tétraspanines[48]. Pour conclure, il est extrêmement difficile de différencier de manière certaine les exosomes des différents types d'EVs. Dans une démarche de normalisation, l'ISEV incite les scientifiques à utiliser le terme générique de vésicules extracellulaires dans les publications. Dans ce manuscrit, le terme vésicules extracellulaires est donc utilisé génériquement. De nouvelles sous-classifications des EVs émergent notamment celle catégorisant les EVs en *small-EVs* ; *medium-EVs* et *large-EVs* et feront l'objet de précision dans les années à venir.

1.a.ii. Mécanismes de communication et fonctions physiologiques

Les EVs peuvent interagir avec les cellules réceptrices par trois mécanismes principaux[40]. Premièrement, la vésicule peut adhérer à la membrane de la cellule réceptrice par l'interaction entre le ligand dédié à la surface de la vésicule et le récepteur cellulaire correspondant (*Mode A, Figure 1.4*). La seconde voie d'action consiste en l'interaction entre les récepteurs de la cellule cible et un ligand soluble provenant des protéines membranaires de la vésicule (*Mode B, Figure 1.4*). Cette dernière peut finalement être internalisée par endocytose ou fusion membranaire dans des compartiments endocytaires de la cellule réceptrice (*Mode C, Figure 1.4*).

Figure 1.4 : Mécanismes d'actions d'interaction d'une vésicule extracellulaire avec une cellule réceptrice, adapté de Mathivanan et al.[44].

Chacun de ces modes nécessite une interaction entre les récepteurs spécifiques à la surface de la vésicule et de la cellule[27]. Une étape de fusion entre la membrane plasmique et la membrane des composants endocytaires se produit et entraine la dégradation des composants propres aux EVs après internalisation. Cette élimination a un rôle dans l'état physiologique de la cellule réceptrice. Un marquage fluorescent des EVs a été réalisé afin de mettre en évidence ce mécanisme d'action des vésicules une fois à l'intérieur des cellules[30,49].

Les fonctions physiologiques des EVs sont classées en quatre catégories selon El Andaloussi[50]. Le maintien et la modulation du phénotypage des cellules[19], la réparation des tissus[51], la coagulation sanguine[52] et la surveillance immunitaire[11] sont les principales fonctions des EVs. Dans une revue très complète, Yáñez-Mó et ses collaborateurs décrivent l'ensemble des propriétés biologiques des EVs ainsi que leurs fonctions physiologiques[7]. Les EVs sont présentes dans tous les liquides biologiques : urine, salive, fluide synovial, bile, liquide cérébrospinal, fluide broncho-alvéolaire, fluide nasal, fluide utérin, fluide amniotique, lait maternel, sang, fèces, et plasma séminal. Dans chaque fluide, les EVs opèrent des fonctions clés à l'équilibre physiologique de l'individu (*Tableau 1.2*).

Fluide biologique	Fonctions associées
Sang	- Fonctions physiologiques des plaquettes - Transmission d'états pathologiques, par exemple par des EVs dérivés de tumeurs
Urine	- Augmentation de la perméabilité à l'eau à travers le néphron grâce aux protéines transporteuses Na^+ - Équilibre de l'eau dans le rein grâce à une enzyme de conversion de l'angiotensine exosomal dans la lumière du tubule rénal - Défense immunitaire des voies urinaires grâce à des protéines immunitaires innées enrichies en EVs - Coagulation et hémostase par les facteurs tissulaires des EVs
Salive	- Clivage de la substance P et des chimiokines avec la protéine CD26 - Initiation à la coagulation du sang
Fluide séminal	- Acquisition de la motilité des spermatozoïdes et réduction du stress oxydatif
Bile	- Interactions avec les cils primaires pour la régulation et la prolifération des cholangiocytes
Fluide broncho-alvéolaire	- Défense immunitaire contre les stimuli externes (nanoparticules, agents pathogènes, allergènes, bactéries)
Fluide nasal	- Fort potentiel d'administration de médicaments au cerveau, aux poumons et aux intestins
Fluide amniotique	- Défense immunitaire du fœtus par modulation de la production intra-amniotique de cytokines par la HSP72
Fluide utérin	- La viabilité, la capacitation et la fécondation des spermatozoïdes par le transport des protéines des EVs (membrane plasmique transportant le calcium ATPase 4 et molécule d'adhésion 1 du sperme) - Processus d'implantation d'embryons grâce aux miARN et aux protéines des EVs
Lait maternel	- Développement du système immunitaire des nourrissons grâce à d'importantes concentrations d'EVs liées au système immunitaire miRNAs
Fèces	- Effet pro-inflammatoire
Fluide synovial	- Mécanismes auto-immuns (peptides citrullinés qui sont des auto-antigènes spécifiques dans la polyarthrite rhumatoïde) - Implication dans les processus inflammatoires des articulations grâce à une phosphoprotéine nucléaire DEK
Fluide cérébrospinal	- Protection contre la bêta-protéine amyloïde, qui perturbe la plasticité synaptique

Tableau 1.2 : Les différents fluides biologiques contenant des EVs et fonctions physiologiques associées aux EVs, traduit du manuscrit de thèse d'E. Pariset[53], d'après Yáñez-Mó et al.[7].

Les principales fonctions physiologiques des EVs concernent notamment :

- **La vascularisation**

Les EVs participent activement à améliorer la coagulation et participent à l'hémostase. De plus, les EVs étaient à l'origine décrites dans les réticulocytes car elles permettent de remodeler la membrane plasmique lors de la maturation en érythrocytes[41,54]. Les réticulocytes sont des cellules érythroïdes immatures générées par énucléation des précurseurs dans la moelle osseuse. Enfin, les EVs dérivées des leucocytes et des plaquettes sont responsables de la délivrance des facteurs pro-angiogéniques aux sites d'angionenèse[55]. Les EVs issues des cellules sanguines mononucléaires seraient impliquées dans le transfert d'ARNm et dans l'induction d'effets pro-angiogéniques *in vitro* et *in vivo*[56].

- **Le système immunitaire**

Le système immunitaire adaptatif permet une protection contre des agents pathogènes spécifiques, avec une réponse renforcée après une première présentation de l'antigène, grâce à la mémoire immunologique. Les lymphocytes B et T sont les principaux lymphocytes du système immunitaire adaptatif. Les antigènes du « non-soi » sont reconnus par des récepteurs sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les récepteurs spécifiques de l'antigène sur les lymphocytes B interagissent avec l'antigène étranger afin de le présenter sur les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH classe II), qui activent des lymphocytes T ($CD4^+$). Ainsi, les lymphocytes T auxiliaires sécrètent des cytokines qui déclenchent la sécrétion d'anticorps provenant d'autres cellules immunitaires et recrutent des macrophages, des neutrophiles et d'autres lymphocytes. En plus de ce mode d'activation, les cellules T cytotoxiques ($CD8^+$) peuvent également être activées par les cellules présentant des molécules du CMH de classe I associées à des antigènes étrangers afin de neutraliser les agents infectieux.

Ainsi, les EVs participent à ce processus d'immunité de quatre manières différentes :

- Elles transportent des antigènes reconnus par les CPA : les antigènes présentés par les exosomes peuvent être soit des protéines transmembranaires de la surface cellulaire de la cellule donneuse soit des protéines internes des compartiments endosomaux de la cellule donneuse. L'activation des lymphocytes T a été démontrée par des exosomes provenant de lignées de cellules tumorales cultivées[57], mais aussi par les macrophages infectés par des bactéries[58] et enfin par des cellules endothéliales infectées par des virus[59].
- Elles présentent directement les complexes peptide-CMH :
  - Les cellules dendritiques libèrent des EVs avec des molécules du CMH de classe I à leur surface[60–63].
  - Les EVs sécrétées par les CPA présentent des molécules du CMH de classe II. Cependant, elles doivent être capturées par les cellules dendritiques pour activer les lymphocytes T auxiliaires[64].
- Elles induisent la transformation des cellules cibles en CPA immunitaires[65].
- Elles présentent des protéines qui ont un effet immuno-suppresseur par différents modes d'actions : l'activation de l'apoptose des lymphocytes T[66], l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T[67], la diminution de la cytotoxicité des cellules *natural killer* et les lymphocytes T cytotoxiques[68], l'inhibition de la différenciation en cellules dendritiques[69] et la génération de cellules dérivées de myéloïdes suppressives[70]. Cet effet tolérogène est très prometteur pour favoriser la survie des greffons[71], la réduction de l'inflammation[72] et des réactions allergiques[73].

- **La réparation tissulaire**

Le changement de phénotype et la plasticité cellulaire sont des facteurs potentiels importants pour la régénération des tissus et s'expliquent de plus en plus par la communication cellulaire et par la délivrance d'ARN provenant des EVs[74]. Par ailleurs, les niches de cellules souches sont considérées comme des zones d'influence micro-environnementale qui fournissent l'oxygénation, la mécano-transduction, les facteurs solubles. La régénération semble, en partie, régulée par le transfert des EVs.

- **La régulation du système nerveux**

Des EVs sont sécrétées par les cellules neuronales et gliales du système nerveux central[75]. Les terminaux neuronaux présynaptiques produisent à la fois des vésicules synaptiques et des EVs[76]. Les vésicules synaptiques sont des vésicules de 35 à 55 nm[77] de diamètre qui libèrent des neurotransmetteurs à la synapse par fusion déclenchée par le calcium avec la membrane plasmatique présynaptique[78]. Depuis 2006[79], les EVs apparaissent comme un nouveau type de vésicule synaptique, qui est sécrété par l'axone pour transporter non seulement des neurotransmetteurs mais aussi des ARN, des protéines et des lipides[80]. En parallèle de l'échange moléculaire, les EVs ont de nombreux rôles dans le système nerveux central dont la myélinisation des axones pour augmenter la vitesse de conduction du signal[33], la plasticité des synapses, l'activation des synapses et la fourniture en facteurs neurotrophiques[81].

1.b. Des biomarqueurs prometteurs

1.b.i. Importance de la biopsie liquide pour le diagnostic médical

Selon le *National Cancer Institute*, considéré comme la principale agence de recherche sur le cancer aux États-Unis, une biopsie liquide est « un test effectué sur un échantillon de sang pour la recherche de cellules cancéreuses ou de frements d'ADN provenant d'une tumeur et circulant dans le sang »[82]. Aujourd'hui, cette définition ne semble pas tout à fait complète. En effet, la biopsie liquide correspond à l'analyse d'un fluide biologique par recherche de biomarqueurs d'intérêt dans le fluide biologique (sang, urine, liquide céphalo-rachidien …). La biopsie liquide n'est pas uniquement utilisée pour la détection ou le suivi de cancer, elle peut être envisagée pour le diagnostic prénatal ou des infections de type *sepsis* par l'analyse de séquences d'ADN circulants spécifiques.

Par son caractère peu invasif, cette méthode est privilégiée pour suivre l'évolution de maladies disposant de biomarqueurs établis comme le suivi des leucocytes lors d'un traitement de chimiothérapie. Cependant, très peu de biomarqueurs sont validés pour la détection de cancer notamment. En effet, à l'heure actuelle, la seule indication clinique validée par les agences de santé est la recherche de la mutation du facteur *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) pour le diagnostic du cancer bronchique. Les enjeux de standardisation de la biopsie liquide pour le diagnostic sont colossaux à la fois en termes de confort vis-à-vis du patient, de rapidité d'analyse mais aussi d'un point de vue économique pour les institutions de santé publique.

Aujourd'hui, plus de 250 laboratoires et 250 industriels dans le monde travaillent sur l'utilisation de la biopsie liquide dans des systèmes microfluidiques pour la standardisation de la biopsie liquide en clinique[83]. Ces recherches se tournent principalement vers la détection de cellules tumorales circulantes (CTCs) ou de biomarqueurs (protéiques ou issus d'acides nucléiques) circulants ou contenus dans les vésicules extracellulaires.

Quels sont les biomarqueurs d'intérêt issus des vésicules extracellulaires pour ces différentes pathologies ? La section suivante propose une revue des principales pathologies pour lesquelles les EVs peuvent contribuer à identifier des biomarqueurs d'intérêt.

1.b.ii. Cancers

Le diagnostic d'un cancer est principalement réalisé par biopsie tissulaire. Cette technique requiert l'extraction d'un échantillon tumoral solide suffisant. Elle se révèle être particulièrement douloureuse et parfois compliquée pour les organes profonds tel que le pancréas. En outre, l'hétérogénéité intratumorale rend le diagnostic par biopsie tissulaire parfois très difficile[84]. Par conséquent, le diagnostic non invasif par de nouvelles méthodes est nécessaire pour détecter un cancer dans les stades précoces de la progression de la tumeur, personnaliser, suivre et détecter l'émergence de résistances aux traitements[85]. Le diagnostic actuel du cancer souffre de l'absence de biomarqueurs spécifiques et de la variabilité de la concentration des biomarqueurs connus, ce qui conduit à de nombreux cas de faux positifs ainsi qu'à de nombreux problèmes de surtraitement[86].

La biopsie liquide peut être basée sur trois types d'objets dérivés de la tumeur dans les fluides corporels : les CTCs, les acides nucléiques circulants (ADN/ARN) et les EVs. Les EVs dérivées de tumeurs présentent plusieurs avantages par rapport aux CTCs et aux acides nucléiques pour les applications de biopsie en

milieu liquide. Elles présentent une plus grande stabilité, elles permettent l'analyse des protéines (comme les CTCs) et leur concentration est beaucoup plus élevée que les niveaux de CTCs dans les fluides corporels (environ 10^{12}/mL pour les EVs[87] contre 10-100/mL pour les CTCs[88] dans le sang). De plus, les EVs sont sécrétées par les stades précoces du développement métastatique, beaucoup plus tôt que la première détection possible des CTCs dans les fluides biologiques[89].

L'échange d'EVs contribue au développement du cancer à partir de cellules cancéreuses malignes par différents mécanismes[90–93] :

- Le développement des tumeurs par la stimulation de la prolifération cellulaire[94–96]
- La tumorigenèse par transformation de cellules souches[97,98]
    - L'augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales moins malignes[99,100]
    - L'activation de myofibroblastes[101]
    - La dégradation de la matrice extracellulaire[102,103]
- L'angiogenèse par la migration, stimulation et formation du tubule dans les cellules endothéliales[104–106,106–111] et l'activation de fibroblastes associés au cancer[112]
- La diffusion de la résistance aux médicaments des cellules cancéreuses[113], des fibroblastes associés au cancer[114], des cellules stromales[115], la limitation des médicaments de chimiothérapie[116], la modulation des immunothérapies[78],
- La suppression de la réponse autoimmune anti-tumorale[117–119] par l'entrée en apoptose des lymphocytes T cytotoxiques[120–122], la suppression de la réponse immunitaire des cellules dendritiques[123,124] et de la régulation des macrophages associés à la tumeur[125,126],
- La préparation de niches pré-métastatiques dans des tissus éloignés[100,127,128], particulièrement en traversant la barrière hémato-encéphalique[129,130] et dans la moelle osseuse[131],
- Le remodelage de la matrice par le transport de métalloprotéines par des EVs dérivant de tumeurs[132],
- L'inflammation qui contribue à la progression du cancer[133].

Les EVs issues de cellules cancéreuses circulent dans le sang pour atteindre des organes éloignés. La circulation des EVs est responsable de l'augmentation du réseau vasculaire, des métastases et de la croissance néoplasique par le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse. En outre, il a été démontré que les EVs libérées dans le cadre d'un cancer du sein favorisent la colonisation de tissus éloignés par l'activation de la transition cellulaire mésenchymateuse à épithéliale[99]. Les mutations tumorales influencent le contenu en ARN des EVs. Ceci apparaît prometteur pour une utilisation des EVs à des fins diagnostiques[21]. Différents biomarqueurs spécifiques de miARN, de lipides et de protéines ont été identifiés dans les EVs en fonction des types de cancers[134].

La quantité d'EVs dans les fluides biologiques est un outil de diagnostic en soi, appelée *Liquid Tumor Mass Diagnosis* par Cappello *et al*.[135]. En effet, la concentration des EVs circulantes est intrinsèquement liée à la tumeur, ce qui permet de diagnostiquer le cancer sans avoir recours à des biomarqueurs spécifiques[136–140]. Quelle que soit la technique de quantification utilisée, toutes les études disponibles montrent une augmentation des concentrations d'EVs avec la progression de la tumeur : comme l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoAssay*) basé sur l'immunocapture[136], la quantification des protéines, l'analyse de suivi des

nanoparticules[141] ou la cytométrie en flux. Les EVs sont également considérées comme de potentiels biomarqueurs dans les traitements de chimiothérapie, par exemple en mesurant les concentrations d'ARNm contenus, qui reflètent la concentration dans les cellules parentales et permettent d'évaluer l'efficacité du traitement[142]. Il convient maintenant de développer des techniques standardisées pour quantifier de manière fiable le niveau d'EVs dans les fluides biologiques pour des applications cliniques.

Différentes sociétés proposent aujourd'hui des tests de diagnostic du cancer à partir d'échantillon exosomal. **Exosome Diagnostics** (New York, USA) a été fondée pour commercialiser des tests de diagnostic basés sur l'ARN exosomal à partir d'échantillons de plasma sanguin. Leur kit exoRNeasy peut être acheté auprès de la société **Qiagen** et permet d'isoler l'ARN exosomal pour une analyse de séquençage poussée afin de détecter et mesurer les niveaux d'expression de gènes liés au cancer et à d'autres maladies à partir d'échantillons d'urine, de plasma ou de sérum.

Exosomics (Sienne, Italie) fournit également des kits d'extraction d'ARN et d'ADN issus du contenu intravésiculaire pour la biopsie liquide et le dépistage du cancer. Quelques millilitres de plasma sont prélevés pour l'isolement des EVs par deux méthodes différentes. La technologie « SeleCTEV » capture les EVs par une méthode d'affinité avec des peptides tandis que le système « SoRTEV » les capture par des billes recouvertes d'anticorps spécifiques contre les antigènes de surface. Exosomics commercialise également des essais analytiques, basés sur des plateformes de type ELISA ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Caris Life Sciences (Dallas, USA) a également développé une technologie d'immunocapture appelée "Carisome" pour capturer les EVs du sang sur des billes enrobées et détecter des protéines de surface spécifiques marquées par fluorescence. Un premier test, à partir d'un échantillon sanguin, est déjà disponible pour le diagnostic du cancer de la prostate et présente une meilleure sensibilité et spécificité par rapport au test *prostate-specific antigen* (PSA) standard.

Enfin, **Exosome Sciences** (San Diego, USA) met au point un test ELLSA (*Enzyme-Linked Lectin-Specific Assay*) pour isoler les biomarqueurs comme TauSome, marqueur non invasif de l'encéphalopathie traumatique chronique à partir d'un échantillon de sang.

Il convient maintenant de développer des techniques standardisées pour quantifier de manière fiable le niveau d'EVs dans les fluides biologiques pour des applications cliniques. Les défis à relever liés au développement d'outils de diagnostic sont de taille. Il est nécessaire de normaliser et simplifier l'isolement des EVs à partir de fluides biologiques non dilués, de détecter et quantifier l'ensemble des biomarqueurs des EVs avec une sensibilité et une spécificité élevées et enfin de collecter des vésicules intègres de manière passive afin d'étudier plus en détails les propriétés structurales et biophysiques en parallèle de l'analyse protéomique et génétique[143].

1.b.iii. Maladies neurodégénératives

Les EVs sécrétées par les cellules neuronales transportent des protéines pathogènes et des miARN dérégulés qui participent au développement des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington et la sclérose latérale amyotrophique[144,145]. Récemment, de nouveaux biomarqueurs exosomaux ont été présentés comme spécifiquement liés aux troubles neurodégénératifs[146]. Par conséquent, comprendre précisément les fonctions des EVs dans les maladies

neurodégénératives pourrait conduire à de nouvelles solutions diagnostiques et thérapeutiques essentielles pour faire face au manque de thérapie disponible pour cette classe de pathologie.

1.b.iv. Maladies infectieuses

Les virus assurent la propagation des infections virales en utilisant les EVs[147,148]. En particulier, différents mécanismes sont utilisés pour la diffusion de l'infection virale[149–151] :

- L'utilisation de la voie de sécrétion vésiculaire pour la production de particules virales ;
- Le transport de ARNm et miARN viraux et de protéines par les exosomes ;
- Le relargage des virus de façon coordonnée avec les exosomes pour échapper à la vigilance immunologique ;
- La modulation de la sécretion d'exosomes par les protéines des virus agissant dans les cellules infectées.

1.b.v. Maladies chroniques

- **Le diabète**

Les cellules β-pancréatiques contribuent à l'homéostasie du glucose et jouent un rôle clé dans le développement du diabète. Les EVs sécrétées par ces cellules contribuent à la progression du diabète en transportant la protéine HSP90 dans les cellules endothéliales[152]. Dans le diabète de type I, il a été démontré que les EVs génèrent un phénomène d'auto-immunité par la prolifération des lymphocytes T, ce qui entraîne la destruction des cellules sécrétrices d'insuline dans le pancréas[153,154]. Par conséquent, les EVs apparaissent comme des biomarqueurs prometteurs pour le diabète de type I. Dans le diabète de type II, les EVs provenant des tissus adipeux, des muscles squelettiques et des hépatocytes jouent un rôle dans la résistance à l'insuline en transportant des protéines fonctionnelles et des séquences d'ARN[155,156] et pourraient être des objets thérapeutiques intéressants.

- **L'arthrite**

Les EVs jouent plusieurs rôles dans l'arthrite (polyarthrite rhumatoïde et arthrose)[157,158] notamment par l'inflammation qu'ils contribuent à entretenir par la présentation d'antigènes et l'activation du système immunitaire, la destruction de la matrice extracellulaire et l'endommagement du cartilage, et le transport de miARN impliqués. Les EVs sont des biomarqueurs potentiels de la polyarthrite rhumatoïde, avec l'identification de deux marqueurs spécifiques : la protéine membranaire citrullinée[159,160] et le miARN-155[161].

1.b.vi. Utilisation thérapeutique : vers la bioproduction des vésicules extracellulaires

Depuis quelques années, les EVs ont aussi emergé comme de nouveaux vecteurs thérapeutiques offrant une alternative à la thérapie cellulaire. Les EVs sécretées par les MSC apparaissent intéressantes par leur fonction directe de médiateurs de régénération cellulaire, faisant des EVs de véritables cargos thérapeutiques[162,163]. De plus, *a contrario* de la thérapie cellulaire, les EVs ne présentent pas de risque particulier à l'injection[50]. En parallèle, les EVs sont capables de réguler le système immunitaire en fonction de leur cellule sécrétrice et du contexte physio-pathologique, révélant ainsi le potentiel des vésicules extracellulaires en immunothérapie[164]. Enfin, par leur activité biologique intrinsèque, les EVs peuvent être conçues avec une composante intravésiculaire spécifique ou avec des propriétés thérapeutiques et de vectorisation particulières[165]. Ceci donne aux EVs la fonction de médiateur thérapeutique. En effet,

différents acides nucléiques et molécules de chimiothérapie ont été administrés en utilisant les EVs comme véhicules-médicaments démontrant une activité thérapeutique significative y compris *in vivo*[166,167]. Cependant, l'utilisation des EVs comme vecteurs thérapeutiques nécessite de standardiser la production de ces objets biologiques. De nombreuses start-up se sont développées depuis 2016 afin de produire des vésicules extracellulaires pour la biothérapie. La start-up française **Everzoom** (Paris, France) mise par exemple sur un système de production des EVs dans un bioréacteur appliquant des forces mécaniques forçant la production des EVs aux cellules sécrétrices. Cette valorisation scientifique a valu la médaille de l'innovation CNRS 2021 à sa co-fondatrice Amanda Brun. Les chercheurs à l'origine de la start-up ont récemment écrit un article de revue décrivant les différentes stratégies mises en œuvre pour accroître le rendement de production d'EVs[168]. Ils pointent notamment les stimulations chimiques ou physiques pour augmenter le nombre d'EVs sécrétées par les cellules mais le choix du type de bio-réacteur est dépendant du type cellulaire choisi. D'autres start-up comme **Evora biosciences** (Paris, France), **Evox therapeutics** (Oxford, UK) ou encore **Codiak Biosciences** (Cambridge, USA) proposent d'utiliser des EVs chimiquement modifiées à des fins thérapeutiques. Enfin, la société **Ciloa** (Montpellier, France) propose une production d'EVs à protéines membranaires natives dans le cadre du développement de candidats médicaments à base d'anticorps.

1.c. Défis actuels autour de la recherche des Vésicules Extracellulaires

Comme présenté dans ces premiers paragraphes, les EVs sont des objets biologiques très prometteurs aussi bien en termes de diagnostic que de stratégie thérapeutique. Cependant, l'intérêt scientifique reste récent et la recherche autour des EVs soulève actuellement de nombreux défis. Comme pointé par Karla et ses collaborateurs[169], différents aspects sont à optimiser afin d'accroître les connaissances sur les fonctions des EVs et leur potentiel. La nomenclature des EVs doit être normalisée pour clarifier les différents types d'EVs, tout de même très complexes à identifier avec précision. De plus, les protocoles d'isolement et de quantification actuels ne sont pas considérés comme entièrement robustes, par conséquent de nouvelles techniques doivent être mises en œuvre et normalisées. Ces techniques doivent aussi être développées de façon à permettre une séparation entre les différentes sous-populations d'EVs. Des efforts sont à mettre en œuvre afin de comprendre les différentes interactions entre les types d'EVs et leurs fonctions relatives. La biogenèse des EVs doit pour cela être mieux comprise en mettant l'accent sur les problématiques de transport des EVs : est-il sélectif ou aléatoire ? Enfin, des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer l'influence de la concentration des EVs dans les liquides biologiques et leur durée de vie. Finalement, la communication entre les EVs n'est pas encore clairement connue alors qu'elle est fondamentale pour développer de nouvelles thérapies.

Depuis 2010, le consortium dénommé « EV-TRACK » initié par la chercheuse belge An Hendrix rassemble 95 participants de 38 laboratoires qui ont évalué plus de 1 250 publications sur la recherche autour des EVs[170]. De plus, depuis sa création en 2011, l'ISEV publie régulièrement des recommandations afin d'encadrer au mieux les pratiques autour des EVs. Ces recommandations ont la forme d'études scientifiques « *Minimal information for studies of extracellular vesicles* » (MISEV)[3,171–173].

Les recommandations principales pour une utilisation standardisée des EVs sont :

- De fournir une analyse de la composition protéique de la préparation d'EVs. L'identification et la quantification relative de plusieurs protéines (au moins trois) sont nécessaires car aucun marqueur spécifique n'a été identifié jusqu'à présent pour prouver spécifiquement la présence d'EVs.
- De caractériser l'hétérogénéité de la population d'EVs par au moins deux méthodes différentes, notamment en ce qui concerne les techniques de mesure de la distribution des tailles qui doivent être comparées aux observations microscopiques.
- Lorsque l'action de protéines vésiculaires ou d'espèces d'ARN spécifiques est démontrée, il est alors nécessaire de vérifier que ces composants proviennent d'EVs et ne sont pas des molécules solubles co-isolées.

Afin d'appliquer toutes ces recommandations, des techniques d'isolement et de caractérisation robustes sont nécessaires pour disposer d'échantillons d'EVs purs et fournir une analyse complète de la signature exosomale. Dans ce contexte, différents projets européens ont été lancés entre universitaires et industriels afin de caractériser les EVs dérivées de tumeurs par différentes technologies (Cancer-ID, ExoTENPO …).

Les techniques d'isolement et les méthodes de caractérisation sont présentées dans la section suivante, ainsi que les technologies émergentes permettant de surmonter les limites des méthodes actuelles.

2. Méthodes d'isolement et de caractérisation des vésicules extracellulaires

De nombreuses revues répertorient les méthodes d'isolement et de caractérisation des EVs[174–176]. Cette seconde partie recense les méthodes incontournables notamment utilisées dans les travaux qui seront exposés au cours des chapitres suivants.

2.a. État de l'art des méthodes standard d'isolement

2.a.i. Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle est la première méthode décrite pour l'isolement des EVs par Clothilde Théry en 2006[46]. Le principe de centrifugation repose sur le coefficient de sédimentation d'une particule :

$$s = \frac{m}{6\pi\eta r}$$

avec m = masse de la particule ; η = viscosité du milieu et r = rayon de la particule.

Le principe de la centrifugation différentielle pour l'isolement d'EVs repose sur la précipitation progressive des élements du milieu. Les objets les plus denses sédimentent les premiers : les cellules puis les cellules mortes et enfin les débris cellulaires. Les EVs peuvent alors être concentrées. En pratique, on réalise une première centrifugation à faible vitesse pour éliminer les cellules puis on augmente petit à petit la force de centrifugation pour obtenir des culots de particules de plus en plus petites (*Figure 1.5*) en terminant par l'ultracentrifugation (UC).

Figure 1.5 : Schéma du processus de centrifugation différentielle décrite par Théry et al.[46] Images de microscopie électronique[177].

Des recommandations de l'ISEV sont établies et sont publiées régulièrement définissant les conditions optimales à utiliser pour l'isolement d'EVs par centrifugation différentielle notamment. Ces conditions sont à adapter en fonction des équipements utilisés (rotor, type de centrifugeuse ...). Une étude théorique et expérimentale a été établie afin de définir les paramètres à choisir en fonction de ces différentes méthodes car le temps de centrifugation sera entre autres à définir en fonction du facteur k du rotor comme établi par l'équation ci-dessous :

$$T = \frac{k}{s}$$

avec T = temps de centrifugation (h) ; k = facteur k du rotor ; s = coefficient de sédimentation (h^{-1})

De plus, la centrifugation différentielle dépend du liquide biologique à partir duquel l'isolement d'EVs est réalisé et pourra varier en fonction du milieu de culture cellulaire, urine ou plasma sanguin.

2.a.ii. Gradient de densité

Cette méthode permet d'isoler des particules en couplant deux paramètres de séparation physique : leur densité et leur taille. Très fréquemment, cette méthode est couplée à l'ultracentrifugation afin d'obtenir un échantillon d'EVs pur. Deux types de gradients de densité peuvent être utilisés en faisant varier le dépôt de l'échantillon : *top* ou *bottom loading*[178,179]. Le *top loading* privilégie la séparation par taille en limitant la contribution de la densité des particules car l'échantillon est soumis à la force centrifuge. *A contrario*, le

bottom-loading favorise la séparation en fonction de la densité des particules. Les gradients sont généralement préparés à partir du sucrose ou de l'iodixanol pour les EVs. L'iodixanol a l'avantage d'avoir une faible viscosité et d'être iso-osmotique n'affectant pas l'intégrité des EVs à l'inverse du sucrose qui est visqueux et hyper-osmotique. Cette méthode apparaît alors très intéressante en complément de la centrifugation différentielle pour l'obtention d'un échantillon d'EVs avec une pureté optimale comme démontré par Van Deun *et al.*[180] ; mais aussi pour permettre l'isolement d'une sous-population en fonction de la taille ou de la densité (*top or bottom loading*).

2.a.iii. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet de séparer des objets biologiques ou moléculaires en plusieurs fractions de différentes tailles. Le principe de séparation par SEC repose sur l'utilisation d'un gel spécifique pour une gamme de taille définie dans une colonne. Les particules les plus grandes ne peuvent pas entrer dans le gel et sont exclues. Elles ont moins de volume mort à traverser le long de la colonne et sont éluées rapidement. Les particules plus petites, d'intérêt et dont la gamme de taille a été définie préalablement, entrent dans le gel et sont éluées dans un second temps. L'utilisation de ce type de séparation par un gel de sépharose comme étape unique d'isolement des EVs a été décrite par l'équipe hollandaise de Nieuwland[181] et a mis en avant la pureté de l'échantillon obtenu dans le cas de la séparation des EVs des agrégats protéiques et des lipoprotéines. Les colonnes disponibles dans le commerce pour l'isolement d'EVs, notamment les qEV de la société **Izon** (Oxford, UK), ont été utilisées pour fractionner efficacement les échantillons d'EVs après les étapes de centrifugation[182]. Un des inconvénients majeurs de l'utilisation de la SEC est l'obtention d'un échantillon relativement dilué en sortie de colonne et la nécessité d'effectuer une étape ultérieure d'UC pour concentrer les fractions isolées d'EVs. Différents articles établissent des comparaisons de l'UC avec la SEC[183–186]. La SEC permet notamment, d'après ces études, une altération moindre des EVs après isolement et une meilleure préservation de l'intégrité membranaire et fonctionnelle. Dans une revue très intéressante, Sáenz-Cuesta *et al.* ont comparé plusieurs protocoles standards d'isolement des EVs afin d'identifier la technique la plus facile à mettre en œuvre dans un environnement hospitalier[187]. Ils rapportent que la majorité des différentes techniques d'isolement pourrait être mise en œuvre à l'hôpital, sauf l'UC, qui nécessite des équipements qui ne sont généralement pas disponibles dans ces établissements. Cependant, aucune technique actuelle ne permet d'obtenir à la fois une concentration en EVs élevée, une grande pureté, une conservation de l'intégrité des EVs et la sélection spécifique de vésicules et à faible coût.

2.a.iv. Précipitation par agents polymères

L'isolement des EVs par précipitation est une solution privilégiée par les utilisateurs disposants de peu de moyens techniques au laboratoire. Les polymères d'exclusion de volume (principalement le polyéthylène glycol) vont permettre une exclusion stérique des objets biologiques tels que les EVs, virus et protéines. Ces entités sont exclues des régions du solvant occupées par les polymères synthétiques inertes et sont donc concentrées jusqu'à ce que leur solubilité soit dépassée et qu'une précipitation se produise généralement en une nuit. Une centrifugation à faible vitesse est ensuite effectuée pour récupérer les EVs dans le tampon choisi. De nombreux kits commerciaux sont désormais disponibles et comparés dans la revue de Vanni[188] mettant notamment en avant les kits suivants : *Total Exosome Isolation* (**Life Technologies**), *Exoquick* (**System Biosciences**), *Exoprep* (**Hansabiomed**). Des méthodes non commerciales sont aussi utilisables au laboratoire. Une première méthode recensée est basée sur l'utilisation d'un

tampon acétate[189] qui permet l'obtention de résultats similaires aux autres méthodes en termes de rendement et de morphologie des vésicules mais implique une grande contamination due à la co-précipitation des protéines hydrosolubles. La seconde méthode est basée sur l'utilisation d'un système dénommé *Protein Organic Solvent Precipitation* (PROSPR)[190] dont l'avantage principal est l'exclusion d'une grande quantité des lipoprotéines aboutissant à un échantillon d'EVs moins contaminé que par l'utilisation du tampon acétate. Les avantages indéniables de la précipitation pour l'isolement d'EVs sont la flexibilité, le faible coût, le faible besoin en équipement et en technicité, la compatibilité avec des petits (µL) et grands (dizaine de mL) volumes d'échantillons, l'application en clinique pour des visées thérapeutiques et la validation de biomarqueurs[191]. Cependant, le co-isolement de lipoprotéines et d'agrégats protéiques aboutit à un bon rendement d'EVs mais une pureté moindre nécessitant la mise en œuvre d'expériences de « contrôle qualité » telles que le *western blot* (WB), l'analyse de suivi de nanoparticules (NTA) et la microscopie électronique (ME) notamment.

En conclusion à cet exposé sur les méthodes d'isolement d'EVs, un tableau comparatif des différentes techniques d'isolement est présenté ci-dessous [180,186] (*Tableau 1.3*).

*Tableau 1.3 : Comparaison des quatre méthodes en termes de facilité d'utilisation, de durée d'isolement, de temps de manipulation, coût approximatif (en fonction du coût des tubes de centrifugation et des solutions requises), de volume d'échantillon biologique initial utilisé, de rendement en EVs (microscopie électronique), de rendement en protéines et en ARN et de pureté (basée sur les résultats combinés de microscopie électronique, Western blot, de la coloration au bleu de Coomassie et de spectrométrie de masse). Légende : * : faible ; ** : modéré ; *** : élevé ; **** : très élevé. Adapté de Van Deun et al.[180], Takov et al.[186].*

Toutes ces méthodes permettent l'isolement d'EVs mais l'utilisation du gradient de densité (Opti-DG) dépasse l'ultracentrifugation et la précipitation par agents polymères en termes de pureté d'échantillon. La centrifugation différentielle reste la méthode de référence d'isolement malgré le coût lié à l'achat d'une ultracentrifugeuse, la mise en œuvre relativement longue et la pureté obtenue relative. Cependant il est important de garder à l'esprit que chaque méthode impacte significativement l'analyse des protéines et du contenu en ARN ce qui peut influer sur l'identification des biomarqueurs relatifs aux EVs. Kalra et ses collaborateurs[169] ont fait état des difficultés actuelles liées à l'isolement des EVs pointant notamment le manque de pureté des échantillons isolés (agrégats de protéines, des virus et d'autres biomolécules), la perte d'échantillon et les altérations d'intégrité en raison des forces centrifuges et mécaniques des protocoles et enfin la nécessité de la standardisation des protocoles d'isolement pour permettre une véritable comparaison des résultats entre eux. Pour ces raisons, de nouvelles techniques d'isolement

basées sur la microfluidique apparaissent peu à peu. Elles visent à accélérer la préparation des échantillons d'EVs, à rendre portable le système d'isolement, avec un rendement élevé, une procédure facile et sans endommager l'intégrité des EVs. De plus, l'isolement des EVs basé uniquement sur un tri de l'échantillon en taille n'est pas suffisant pour l'obtention d'un échantillon relativement pur. Les méthodes d'isolement par affinité peuvent aussi apporter des solutions intéressantes et seront abordées plus tard dans ce chapitre.

2.b. État de l'art des méthodes de caractérisation

La caractérisation en taille, en marqueurs de surface, en concentration et en quantité des EVs présente des problèmes inédits/originaux/inhabituels :

- La plupart des EVs sont de très petites tailles, en dessous de la résolution de la microscopie conventionnelle ou de la cytométrie en flux ;
- Les mesures ont préférentiellement lieu dans un milieu aqueux isotonique ;
- Les EVs présentent un faible indice de réfraction ;
- La population d'EVs est souvent polydisperse ;
- Les lipoprotéines créent des interférences dans le sang (taille de même ordre de grandeur) ;
- Le nombre d'antigènes sur les EVs est faible.

2.b.i. Caractérisations physiques : taille, masse et concentration

2.b.i.1. Analyse du suivi de nanoparticules (NTA)

L'analyse de suivi des nanoparticules (NTA) est une méthode de diffusion de la lumière qui permet de déterminer à la fois la distribution de taille et la concentration de particules avec une résolution s'étirant de 50 nm à 1 µm. Outre la mesure de l'intensité de la diffusion d'un faisceau laser, la vitesse moyenne de chaque particule individuelle est déterminée à l'aide de la méthode Stokes-Einstein à partir du mouvement brownien enregistré par une caméra CCD (*Figure 1.6*). En raison de sa commodité de mise en œuvre, de sa rapidité de traitement et de sa résolution pour les échantillons polydisperses, le NTA est la méthode la plus largement utilisée pour caractériser la taille et la concentration des EVs, même si la limite du microscope rend l'analyse impossible en dessous de 50 nm. En mode fluorescent (f-NTA), la limite de résolution peut être améliorée en marquant par fluorescence des vésicules spécifiques qui présentent une cible protéique[192]. La principale limite de cette technique de caractérisation est la dépendance de la concentration et de la distribution de taille obtenues par rapport aux paramètres de détection choisis, tels que le niveau de la caméra (combinaison du temps d'obturation et du gain de la caméra) et le seuil de détection (intensité minimale requise pour être attribuée à une particule, environ 10^6 particules/mL). C'est pourquoi une étape de calibration à l'aide de billes de silice est intéressante pour la caractérisation d'EVs, particulièrement parce que les indices de réfraction des EVs et des nanoparticules de silice sont proches.

Figure 1.6 : Principe de détection de particules par NTA. Lors de la mesure NTA, le faisceau laser focalisé traverse les particules en suspension. La lumière diffusée par chaque particule dans le champ de vision est détectée par la caméra du microscope.

Le NTA présente quelques limitations pour la mesure de concentration d'EVs car en effet :

- L'indice de réfraction est faible ;
- Il y a un risque de perte de particules dans les échantillons dilués (il faut donc diluer juste avant la mesure et utiliser des temps de mesure courts environ 30 secondes à 1 minute) ;
- L'incertitude est élevée sur les échantillons polydisperses (il faut veiller à augmenter le nombre de mesures) ;
- Les particules les plus grosses peuvent être sur-estimées ;
- La calibration à l'aide de billes de silice ou d'or est à faire relativement souvent (cinq fois par an).

2.b.i.2. *Tunable Resistive Pulse Sensing* (TRPS)

La technique de comptage de particules uniques à travers un nanopore ou *Tunable Resistive Pulse Sensing* (TRPS) est une technique dérivée du principe de Coulter et basée sur la mesure d'impédance au passage d'un électrolyte contenant des particules à travers un pore. Elle permet de déterminer le nombre de particules, leur concentration et le potentiel ζ des particules. La taille des nanopores doit être suffisamment petite pour détecter les particules, car la sensibilité des instruments TRPS dépend du rapport entre la taille des particules et le diamètre des pores, qui devrait être compris entre 0,1 et 0,7[193]. Par conséquent, afin de mesurer une population polydisperse d'EVs, plusieurs pores doivent être montés en cascade avec des limites de détection différentes. Maas *et al.* ont mis en évidence l'influence de la taille des pores sur les concentrations en particules mesurées[194]. Selon la dimension de leurs pores, les instruments TRPS peuvent mesurer les particules de 50 nm à 10 μm[195] et des développements récents ont montré de nouvelles améliorations dans la mesure de stabilité et sensibilité[196], même si la limite de détection doit encore être réduite afin d'analyser toutes les tailles des vésicules. Le principal problème lié à l'utilisation du TRPS pour la caractérisation des EVs est le risque de passage de plusieurs particules simultanément dans le pore (qui sont détectées comme une seule grande particule), et le risque d'obstruction du pore ou d'adhésion de protéines à la surface des pores. En effet, comme la détermination de la taille des particules dépend du diamètre des pores, toute modification de la taille des nanopores avec l'adhésion de contaminants est responsable d'erreurs de mesure. C'est pourquoi une étape de préparation minutieuse de l'échantillon doit

être effectuée avant la mesure TRPS afin d'éliminer les contaminants les plus grands et les protéines, ainsi que des dilutions adaptées. En outre, plusieurs calibrations doivent être effectuées continuellement (deux fois par échantillon) pour connaître précisément les dimensions des pores utilisés pour chaque mesure, et ceci augmente considérablement le temps de manipulation. Le TRPS a l'avantage de pouvoir être facilement combiné avec d'autres techniques de caractérisation comme la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la cytométrie en flux de fluorescence ou la spectroscopie Raman. De plus, le potentiel ζ et la charge de surface peuvent également être déterminés à partir des mesures TRPS grâce à la relation entre la taille et la position des particules par rapport aux dimensions des pores et à la résistance[197]. Les instruments TRPS sont commercialisés, comme l'instrument qNano (**Izon**, UK). Cet équipement permet de caractériser des particules de 40 nm à 10 μm, grâce à des pores étirables en membrane de polyuréthane. Le TRPS et le NTA ont été récemment comparés par Akers *et al.*[198]. Cette étude a montré que le NTA a détecté plus d'EVs de taille inférieure à 150 nm, tandis que le système TRPS était plus efficace pour détecter les EVs de grande taille.

2.b.i.3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) utilise la diffusion d'un faisceau laser par des particules soumises au mouvement brownien, afin de déterminer leur taille. En effet, les variations de l'intensité de la lumière diffusée sont directement liées à la taille des particules. Grâce à un algorithme mathématique, le diamètre moyen des particules peut être calculé, en supposant une forme sphérique des EVs. De plus, la plupart des instruments DLS mesurent également le potentiel ζ des particules chargées en appliquant un champ électrique et en mesurant la vitesse de migration. Bien que cette technique soit rapide et pratique, elle n'est pas bien adaptée aux échantillons de taille hétérogène tels que les EVs et les modèles de post-traitement des résultats s'appliquent uniquement à une ou plusieurs populations monodisperses. En effet, lorsqu'un échantillon polydisperse est traité, la distribution des valeurs de taille peut être biaisée en faveur des grosses particules, car l'intensité de la lumière diffusée augmente avec la taille des particules[199]. L'évolution de la distribution de taille vers une gamme de diamètre plus élevé pour les populations des EVs a été observée par Van der Pol *et al.*[192]. Ce biais peut même rendre de petites vésicules indétectables. C'est pourquoi une préparation préliminaire des échantillons d'EVs visant à les fractionner en sous-populations est nécessaire si l'on souhaite utiliser la DLS.

2.b.i.4. Microscopie électronique (ME)

La microscopie électronique (ME) permet d'obtenir des images d'EVs avec une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Les images sont obtenues soit par transmission du faisceau d'électrons à travers l'échantillon (microscopie électronique à transmission, TEM) soit par diffusion inélastique du faisceau d'électrons à la surface de l'échantillon (microscopie électronique à balayage, MEB). Le TEM est la technique de ME la plus courante pour la caractérisation des EVs en raison de sa meilleure résolution. Comme les observations de ME sont effectuées sous vide, les EVs doivent d'abord être fixées chimiquement et déshydratées pour être observées. Le protocole de préparation des échantillons le plus courant consiste à déposer une goutte d'échantillon liquide sur la grille, à le fixer au moyen d'un traitement chimique au paraformaldéhyde[182] ou au glutaraldéhyde[42] puis à le déshydrater (*Figure 1.7).* Parfois, ces traitements chimiques sont responsables d'artéfacts sur la morphologie et la taille des EVs. Le culot contenant les EVs à la fin du protocole de centrifugation différentielle peut également être fixé directement et sectionné en tranches ultrafines[199], même si ce deuxième protocole est plus laborieux que le premier, il

permet d'éviter des problèmes d'adhésion de certaines vésicules sur la grille et d'augmenter la concentration des EVs. La congélation cryogénique, précédent les observations de ME, est une technique de préparation de plus en plus utilisée permettant de remplacer les étapes de fixation chimique[42]. Cependant, des modifications de la taille et de la structure naturelle des vésicules peuvent encore se produire dans le cryo-TEM en raison de l'épaisseur de glace (généralement de l'ordre de quelques centaines de nanomètres), qui peut comprimer les vésicules les plus grandes et les faire paraître plus larges. De plus, la forte intensité du faisceau d'électrons peut être responsable de dommages causés aux EVs[200] (*Figure 1.7*). Des biomarqueurs de surface spécifiques peuvent être colorés par le marquage or-anticorps afin de détecter des sous-populations d'EVs, comme le rapportent Melo *et al.* qui ont spécifiquement imagé les EVs provenant de cellules de cancer du sein exprimant la protéine CD9 à leur surface[201].

Figure 1.7 : (a) Observations TEM de la structure en forme de coupe des EVs après fixation chimique. Agrandissement : marquage des antigènes exosomaux de surface du CMH de classe II avec des particules d'or de 10 nm[42]. (b) Observations TEM des EVs après fixation cryogénique et rupture de la membrane des vésicules[200].

2.b.i.5. Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM), inventée en 1986 par Binning, Quate et Gerber, représente l'un des outils les plus performants pour réaliser des images à haute résolution de nanoparticules individuelles[202] de quelques nm[203]. Le principe de cette méthode opto-mécanique est basé sur les forces d'interaction locales entre la pointe du micro-levier et l'échantillon[204]. Cette technique d'imagerie est largement utilisée pour obtenir la topographie de surface des EVs en balayant la surface de l'échantillon avec une pointe vibrante (mode *tapping*). La fixation des vésicules sur une surface particulièrement plate est nécessaire avant l'imagerie par AFM. Dans la plupart des cas, des surfaces de mica revêtues d'anticorps spécifiques aux biomarqueurs de surface des EVs sont mises en œuvre pour l'imagerie AFM permettant alors de détecter des sous-populations d'EVs[205]. Les étapes de fixation et de déshydratation dans le protocole de préparation peuvent modifier la morphologie des EVs, c'est pourquoi la phase liquide est préférable à l'air pour la caractérisation des EVs par AFM[206]. Whitehead et ses collaborateurs[207] ont comparé la rigidité d'EVs issues de différentes lignées cellulaires par la méthode *PeakForce*, mais les mesures de déformabilité peuvent être discutables si l'on considère l'impact du procédé de fixation sur la rigidité de ces vésicules de petites tailles.

2.b.i.6. Émergence de capteurs de masse microfluidiques : résonateurs SMR/SNR

Les résonateurs avec des canaux microfluidiques intégrés, dénommés SMR (*Suspended Microchannel Resonators*) sont des capteurs de masse permettant de détecter un objet biologique unique et d'en mesurer

la masse. Le concept a été mis au point au MIT par le groupe du professeur Manalis. La mesure de la masse flottante des particules individuelles est effectuée à partir de l'enregistrement de la variation de la fréquence de résonance du résonateur alors que les particules s'écoulent dans le canal fluidique[208] (*Figure 1.8a et b*). Parmi les différentes applications possibles offertes par ce principe de caractérisation, on peut citer la détection et le suivi de la réponse de cellules cancéreuses exposées à différents médicaments à partir de leur taux d'accumulation de masse[209,210], la mesure du taux de croissance d'une seule cellule à l'aide de SMR en série[211] et le suivi du séquençage de l'ARN de cellules individuelles tout au long du cycle cellulaire[212]. En plus des mesures de masse, ces composants permettent également d'acquérir des informations sur la déformabilité des particules individuelles ou leur densité[213].

Ces nouveaux capteurs pourraient permettre la caractérisation physique de la masse des EVs et apparaissent comme une méthode complémentaire aux méthodes physiques actuelles. Par optimisation du dispositif pour la mesure de nanoparticules, un histogramme de taille de différentes populations d'EVs a pu être obtenu[214] (*Figure 1.8b*). Le concept des SNR (*Suspended Nanochannel Resonators*) a été développé, y compris au sein du CEA Leti, pour permettre la mesure de masses de nanoparticules avec une résolution jusqu'à l'attogramme (10^{-18} g)[215–217].

Figure 1.8 : a) Image de microscopie électronique d'un composant SMR fabriqué au CEA Leti ; b) Principe de mesure de la masse flottante à partir de composantSNR[218] et application à la pesée des exosomes d'hépatocytes et de fibroblastes, avec les histogrammes de taille correspondants à partir de la densité estimée, adapté de Olcum et al.[214].

2.b.ii. Caractérisations biochimiques

2.b.ii.1. Quels biomarqueurs pour cibler les vésicules extracellulaires ?

Les biomarqueurs utilisés à partir de l'isolement des EVs sont de nature (acides nucléiques, protéines, lipides) et localités différentes (membranaires ou intravésiculaires) comme décrit dans la *Figure 1.9*. En ce qui concerne la détection d'EVs fonctionnelles, les composants les plus pertinents à cibler se situent au niveau membranaire. Différents types de biomarqueurs membranaires sont exposés ci-après principalement de nature protéique ou lipidique. La figure ci-dessous résume les différents biomarqueurs à cibler pour détecter les EVs fonctionnelles.

Figure 1.9 : a) Les EVs sont des vésicules lipidiques provenant de cellules parentales et sont souvent classées en fonction de leur mécanisme de sécrétion. Elles bourgeonnent à partir de la membrane plasmique des cellules ou sont libérées à partir de vésicules intraluminales si les endosomes multi-vésiculaires fusionnent avec la membrane plasmique. b) Détails sur la composition biochimique de la membrane externe des EVs, en énumérant plusieurs des marqueurs de surface ciblés décrits, adapté de Gaillard et al.[26].

2.b.ii.1.1. Protéines membranaires constitutives

Une première catégorie de biomarqueurs protéiques sont les protéines membranaires ayant un rôle constitutif des EVs : les tétraspanines. Ces protéines sont considérées comme une superfamille protéique disposant de quatre domaines transmembranaires avec quelques caractéristiques notables : six résidus Cystéine extracellulaires, des résidus polaires en position transmembranaire, différents sites de palmitoylation pour la plupart glycosylés[219]. Cette famille de protéines est impliquée dans une multitude de processus biologiques comme l'adhésion cellulaire, la mobilité ou la signalisation et le trafic protéique. Les cinq régions critiques des tétraspanines et leur organisation en microdomaines membranaires sont fondamentales pour leur rôle dans ces processus[220,221]. Les tétraspanines CD9, CD63, CD37, C D81, ou CD82 sont particulièrement abondantes dans la membrane des EVs et particulièrement des exosomes et pour cela ils sont communément utilisés comme marqueurs d'EVs. Le CD9 a d'abord été identifié dans des exosomes provenant de cellules dendritiques[222]. Plusieurs études décrivent CD63 et CD81 comme les protéines les plus fréquemment identifiées dans les exosomes et sont donc considérées comme des marqueurs constitutifs des EVs. En fait, dans de nombreuses cellules, la protéine CD63 a majoritairement été décrite comme étant typique des compartiments intracellulaires d'origine endosomique/lysosomale[223]. Les analyses protéomiques ont identifié les tétraspanines CD63, CD81, CD82, CD53 et CD37 dans les EVs dérivés des lymphocytes B, qui sont enrichis plus de 100 fois par rapport au récepteur de la transferrine[224]. D'autres publications répertorient aussi d'autres tétraspanines pour cibler les EVs : CD62P, CD41, CD61, CD41b, CD171, CD613 et E-Cadherin[225–228]. Les tétraspanines reines pour la détection de protéines restent CD9, CD63 et CD81 et peuvent être ciblées simplement par l'utilisation d'anticorps[229].

2.b.ii.1.2. Protéines membranaires spécifiques

De nombreuses protéines membranaires utilisées comme biomarqueurs de cancers, sont aussi présentes à la surface des EVs et peuvent donc être ciblées. Ces protéines sont surexprimées lors de développement de tumeurs : EGFR, EpCAM, CA125, IGF, HER-2[230–233]. De nombreux dispositifs associent ces protéines membranaires spécifiques aux cancers avec des protéines constitutives[228,234]. Différents dispositifs microfluidiques ont utilisé à la fois la protéine CD63 et des protéines associées aux cancers (EpCAM, EGFR, CA125, IGF) pour la détection d'EVs provenant de cellules cancéreuses à partir d'échantillon sanguin[142,235].

2.b.ii.1.3. Lipides

Il a été décrit de manière récurrente que les EVs sont enrichies en phosphatidylsérine chargée négativement[236,237]. Par exemple, Llorente *et al.* ont décrit que la phosphatidylsérine constitue environ 5,5 % des lipides dans les cellules PC-3, ce pourcentage molaire a été doublé dans les EVs issues des cellules PC-3[236]. Les résultats sont légèrement différents pour d'autres types cellulaires[29,238], mais un enrichissement général de la phosphatidylsérine est majoritairement observé à l'échelle des EVs en comparaison des cellules parentales. De plus, il a été démontré que les EVs dérivées des plaquettes et contenant de la phosphatidylsérine sont prothrombotiques, pro-inflammatoires et associées à des troubles cardiovasculaires et maladies métaboliques[239]. Sur ces bases d'enrichissement en phosphatidylsérine, l'équipe de H. Yin a mis au point trois peptides ciblant les membranes lipidiques enrichies des EVs[240]. Les trois sondes peptidiques (MARCKS, MARCKS-ED et C2BL3C) ont été développées permettant l'insertion membranaire profonde en présence de phosphatidylsérine à des concentrations élevées[241–243].

2.b.ii.1.4. Autres cibles potentielles (protéines d'adhésion cellulaire ; *Heat Shock Protein*)

D'autres types protéiques comme les protéines d'adhésion cellulaire ICAM[244] et la superfamille des protéines *Heat Shock Protein* (HSP) ont été décrits comme cibles intéressantes caractéristiques des EVs[245]. Les états pathologiques, tels que le cancer, affectent la quantité et la localisation du contenu en protéines des EVs y compris des HSP[222]. Les équipes de Ouellette et Jimenez ont développé une classe de peptides dénommés Vn qui reconnaît spécifiquement les EVs contenant la protéine HSP70[245–247]. Ce fût la première preuve de principe de l'isolement des EVs en utilisant le peptide synthétique Vn96, les propriétés des EVs ainsi isolées étant tout à fait comparables à celles isolées par UC. Cibler les HSP par le peptide Vn96 permet aujourd'hui une analyse protéomique complémentaire des EVs pour des besoins diagnostiques[248] démontrant une nouvelle fois la pertinence de cibler les protéines HSP des EVs.

2.b.ii.1.5. Biomarqueurs intravésiculaires

De nombreux biomarqueurs potentiels sont aussi contenus à l'intérieur des vésicules. En effet, en 2008, une équipe du *Massachusetts General Hospital* a démontré pour la première fois que les mutations tumorales sont influencées par le contenu en ARN des EVs, celui-ci pouvant alors être utilisé à des fins diagnostiques[21]. L'ARN représente le principal type d'acides nucléiques présent dans les EVs. Ces ARN sont principalement non-codants et sont classés en trois sous-familles : les ARNt (ARN de transfert) ; miARN (micro ARN) et les ARNm (ARN messagers). La quantité et la nature de l'ARN peut varier en fonction du type de cellule d'origine. Une classe particulièrement intéressante est les miARN. En effet, ces molécules d'ARN peuvent rester fonctionnelles entre la cellule sécrétrice et la cellule réceptrice et ont la capacité de réguler la traduction protéique, jouant un rôle clé dans le développement de cancers par exemple[249]. Les courtes séquences d'ARN sont désormais couramment utilisées en recherche pour l'établissement de nouveaux biomarqueurs[250]. Enfin, une banque de données de miARN a été développée et vise à recenser les différents rôles de ces acides nucléiques dans la régulation de processus biologiques[251].

2.b.ii.2. *Western blot* (WB)

La méthode d'analyse par *western blot* (WB) est une méthode biochimique permettant la détection de protéines spécifiques dans un échantillon composé de multiples protéines[136]. Cette méthode permet de vérifier la présence de protéines issues des EVs. Les protéines les plus couramment étudiées sont des marqueurs de surface tels que les tétraspanines (CD9, CD63, et CD81), mais également des protéines cytosoliques et cytosquelettiques (TSG101 et ALIX). Après la lyse des vésicules, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel (généralement SDS-PAGE) et transférées sur une membrane avant d'être révélées par des anticorps spécifiques. Le WB nécessite la purification soigneuse préalable des EVs car les protéines contaminantes ne peuvent être distinguées des protéines exosomales. C'est pourquoi la détection par WB des protéines présentées à la surface des EVs est nécessaire mais ne se suffit pas à elle-même pour prouver la présence des vésicules dans l'échantillon. De plus, la quantité considérable d'EVs utilisées dans ce type d'analyse et la durée de manipulation (2 jours) ne permettent pas d'envisager le WB comme une caractérisation de routine. Ces aspects techniques seront traités dans le **chapitre 2**.

2.b.ii.3. L'ELISA

Le test immuno-enzymatique ou *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) est une technique permettant de détecter les protéines de surface des EVs souvent en colorimétrie avec une grande sensibilité et une quantification possible de la teneur en protéines[252,253]. Il existe quatre grands types de tests ELISA : direct, indirect, *sandwich* et compétitif comme illustré sur la *Figure 1.10*.

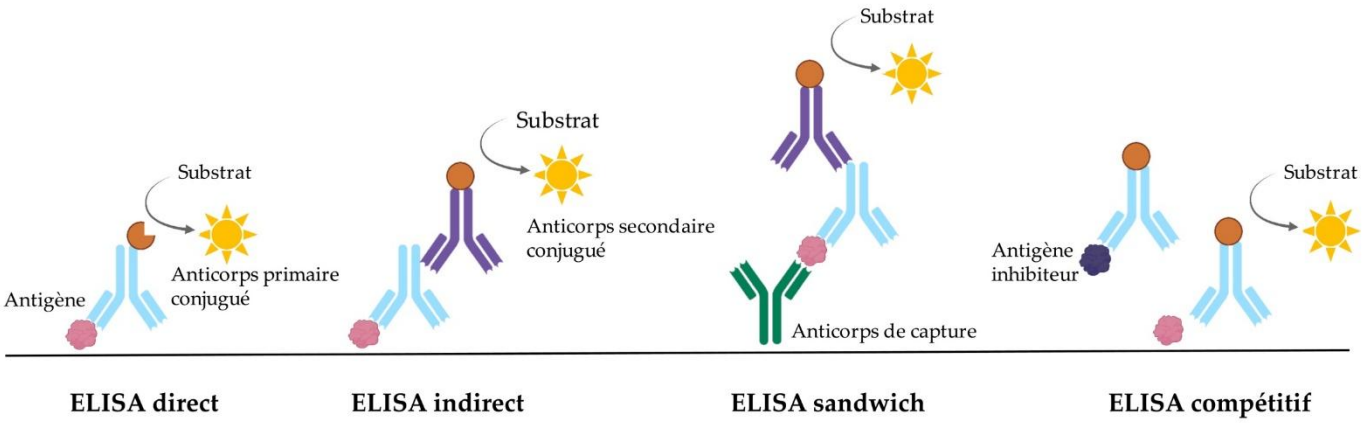


Figure 1.10 : Différents principes des tests ELISA.

Deux stratégies de détection peuvent être utilisées pour observer la présence des protéines ciblées : soit l'anticorps de détection est lié de manière covalente à une enzyme, soit l'anticorps est lui-même détecté par un anticorps secondaire lié à l'enzyme en question. Lorsque le substrat de l'enzyme est ajouté, un changement de couleur est observé en raison de la réaction enzymatique induite. La quantification précise de protéines cibles peut être réalisée par la calibration d'une solution de référence de l'intensité détectée, communément appelée gamme étalon. L'utilisation du test ELISA comme référence pour le développement de technologies de détection d'EVs est largement démontrée[254,255]. Plusieurs kits commerciaux ELISA sont adaptés à l'analyse des protéines des EVs, tels que les kits ELISA spécifiques de **System Biosciences** (Palo Alto, USA). La quantité d'EVs utilisées dans ce type d'analyse, inférieure à celle associée au WB, et la durée de manipulation plus réduite (1/2 journée) confèrent à l'ELISA des propriétés adéquates pour l'utilisation en routine de cette technique. Ces aspects techniques seront traités dans le **chapitre 2**. Cependant, il est encore difficile de trouver des anticorps spécifiques pour chaque sous-catégorie d'EVs. Pour faire face aux inconvénients des sondes anticorps, les aptamères sont de plus en plus utilisés pour l'élaboration de méthodes biochimiques de détection des protéines membranaires vésiculaires[256–258].

2.b.ii.4. Cytométrie en flux (FACS)

La cytométrie en flux assistée par fluorescence (FACS) a été développée à l'origine pour la caractérisation des cellules par l'enregistrement des intensités de diffusion et de fluorescence lorsque les particules individuelles s'écoulent devant un faisceau laser. La focalisation permet de générer un flux continu avec des particules individuelles qui entrent successivement dans le volume de détection. Le FACS est une technique adaptée aux cellules principalement, la résolution minimale étant de 1 à 2 µm. Cependant, une adaptation est possible pour les EVs par l'utilisation de microbilles. Cette technique peut donc effectuer la quantification des protéines des EVs de surface en les fixant à des anticorps fluorescents et en mesurant

jusqu'à neuf signaux de fluorescence en même temps. Le principe du FACS est schématisé sur la *Figure 1.11*.

Figure 1.11 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux[259].

Il est en effet possible d'analyser les niveaux d'expression des protéines et les acides nucléiques ainsi que les marqueurs de surface spécifiques CD9, CD63, CD81 des EVs[260]. Koliha *et al.*[228] ont décrit une plateforme originale de cytométrie en flux basée sur des billes multiplexées pour l'analyse de différentes sous-populations d'EVs. Des billes recouvertes d'un maximum de 39 anticorps de capture ont été utilisées pour former un complexe billes-EVs rendant possible l'analyse par cytométrie en flux. La combinaison d'anticorps de capture et d'anticorps de détection marqués par fluorescence a permis d'établir le profil des deux marqueurs de surface ciblés des EVs. Selon l'origine des EVs, lymphocyte T ou plaquette, différentes compositions de tétraspanines ont été caractérisées. Toutefois, il est impossible de distinguer les EVs des agrégats de protéines marquées[261]. Récemment, Stoner *et al.* ont proposé un nouveau flux à haute sensibilité appelé *Vesicle Flow Cytometer* (VFC) pour augmenter spécifiquement le signal fluorescent associé aux EVs[262]. Une étude comparative a montré que les VFC comptaient cependant deux à trois fois moins de EVs que le NTA et le TRPS, peut-être parce que ce système permet d'exclure les agrégats de protéines ou d'autres particules de taille similaire[198]. De plus, **Apogee Flow Systems** (Northwood, UK) commercialise désormais un cytomètre à microflux spécifique dédié à la détection de particules de taille nanométrique, telles que les EVs ou les agrégats de protéines. Une étude comparative a montré que la cytométrie de flux classique a donné des concentrations d'EVs 300 fois plus faibles que les analyses comparatives par NTA et TRPS. En parallèle, le cytomètre dédié Apogee A50 Micro a donné une sous-estimation d'un facteur quinze de la concentration en EVs[263]. En plus de la caractérisation des protéines de surface, la cytométrie en flux donne également des informations sur la taille et la morphologie des particules. Les développements actuels tentent d'abaisser la limite de détection des EVs en utilisant des colorants intercalaires fluorescents membranaires[260]. Cependant, même pour les vésicules de taille supérieure à la limite de détection, il y a une grande incertitude sur le diamètre des particules en raison du biais possible quant aux indices de réfraction des EVs. En effet, l'indice de réfraction des EVs se situe entre 1,36 et 1,45, ce qui correspond à une latitude d'incertitude des tailles d'un facteur cinq[264]. De plus, comme ce qui a été rapporté pour le TRPS, des signaux superposés peuvent se produire lorsque plusieurs vésicules sont contenues dans le volume de détection en même temps[264]. Dans ce cas, plusieurs petites vésicules ne disposant pas d'une intensité de signal suffisante pour être détectées seules sont mesurées

comme une vésicule unique plus grande, et des dilutions adaptées sont alors nécessaires. Cela donne une limitation sur la plage de concentration des particules qui peut être utilisée pour détecter des EVs individuelles : entre 10^7 et 10^{10} particules/mL[204]. Pour surmonter ce problème, il est fortement recommandé d'utiliser des échantillons dilués pour obtenir une "corrélation linéaire entre le taux de dilution et la concentration"[260]. Grâce à sa grande polyvalence, la cytométrie en flux reste l'une des méthodes les plus populaires utilisées par les scientifiques. Les cytomètres en flux sur mesure ou les cytomètres avancés à haute sensibilité[204] sont souvent utilisés pour minimiser les artefacts intrinsèques de cette technique. Concernant les progrès dans ce domaine de recherche tels que l'identification de biomarqueurs caractéristiques de petites vésicules, la caractérisation de la taille et l'application dans le domaine du diagnostic et de la biologie des EVs, le FACS pourrait représenter une technique puissante, mais elle nécessite un équipement personnalisé qui augmente les coûts et réduit l'accessibilité[203]. Un groupe de chercheurs de l'ISEV a publié MIFlowCyt-EV une publication reprenant les bases de la cytométrie en flux pour les EVs[265] avec l'objectif de standardiser les méthodes d'analyse des EVs par le FACS notamment.

2.b.ii.5. Analyses moléculaires : séquencage ADN/ARN

Les techniques permettant l'établissement d'un profil moléculaire pour la caractérisation des EVs comprennent la spectrométrie de masse[266], l'amplification en chaîne par polymérase à transcription inverse quantitative (qRT-PCR) ou encore des bioanalyseurs, qui utilisent l'électrophorèse et la cytométrie en flux pour mesurer la taille et la quantité de matériel génétique et de protéines[267]. Ces techniques permettent d'identifier les protéines transportées et les fragments d'ARN, y compris des séquences comme les miARN, les ARNm et des séquences plus longues. Les kits commerciaux disponibles permettent d'isoler en particulier la totalité de l'ARN contenu dans l'échantillon d'EVs. Un *Exosome Proteomics Service* est proposé par **System Biosciences** (Palo Alto, USA) pour effectuer la spectrométrie de masse du contenu protéique des EVs à partir d'échantillons de liquides biologiques bruts. La détection de mutations spécifiques de l'ARN des EVs est une approche clé pour les applications de diagnostic[268]. La méthode RT-PCR quantitative est généralement utilisée pour des concentrations faibles en acides nucléiques, mais elle nécessite de connaître à l'avance les séquences cibles, ce qui n'est pas toujours adapté aux applications de diagnostic à partir d'EVs où les mutations spécifiques ne sont pas souvent identifiées. Cependant, une fois ces mutations caractérisées, le séquencage d'ARN est un outil puissant pour le diagnostic à partir d'EVs.

2.b.iii. Biocapteurs pour la détection de vésicules extracellulaires

Depuis une décennie, les biocapteurs pour la détection d'EVs sont en pleine expansion. De nombreux systèmes de détection ont été développés comme décrits dans de récentes revues[26,269,270]. La détection d'EVs par le ciblage de leurs protéines membranaires peut se faire à l'aide :

- **De dispositifs microfluidiques composés de nanofils de silicium :**

Hisey *et al.*[271] ont proposé un dispositif microfluidique pour la capture des EVs à partir d'échantillons de sérum en ciblant les EVs avec des anticorps anti-CD9 et anti-EpCAM. Les EVs sont libérées à l'aide d'un tampon à faible pH pour diminuer l'interaction entre la sonde et le ligand, puis neutralisées. Les nanofils de silicium permettent de détecter par variation de courant l'accroche d'EVs sur les anticorps greffés. Un autre mécanisme de libération a été proposé par Qi *et al.*[272]. Ces derniers ont mis au point un dispositif d'isolement des EVs à l'aide de nanofils de silicium poreux recouverts d'anticorps anti-CD63. Les EVs ont

été libérées après 8 heures de dissolution des nanofils, ce qui reste néanmoins plus long que l'isolement des EVs par la méthode d'UC de référence.

La limite de détection (LOD) est également un paramètre important à déterminer dans le champ des biocapteurs. L'intégration de dispositifs de détection à base de cristaux photoniques dans un système microfluidique a permis de distinguer deux populations d'EVs (hôte et parasite) grâce à la spécificité de la capture du CD63[273] avec une LOD de 2,18×10^9 EVs/mL, comme le montre la *Figure 1.12*.

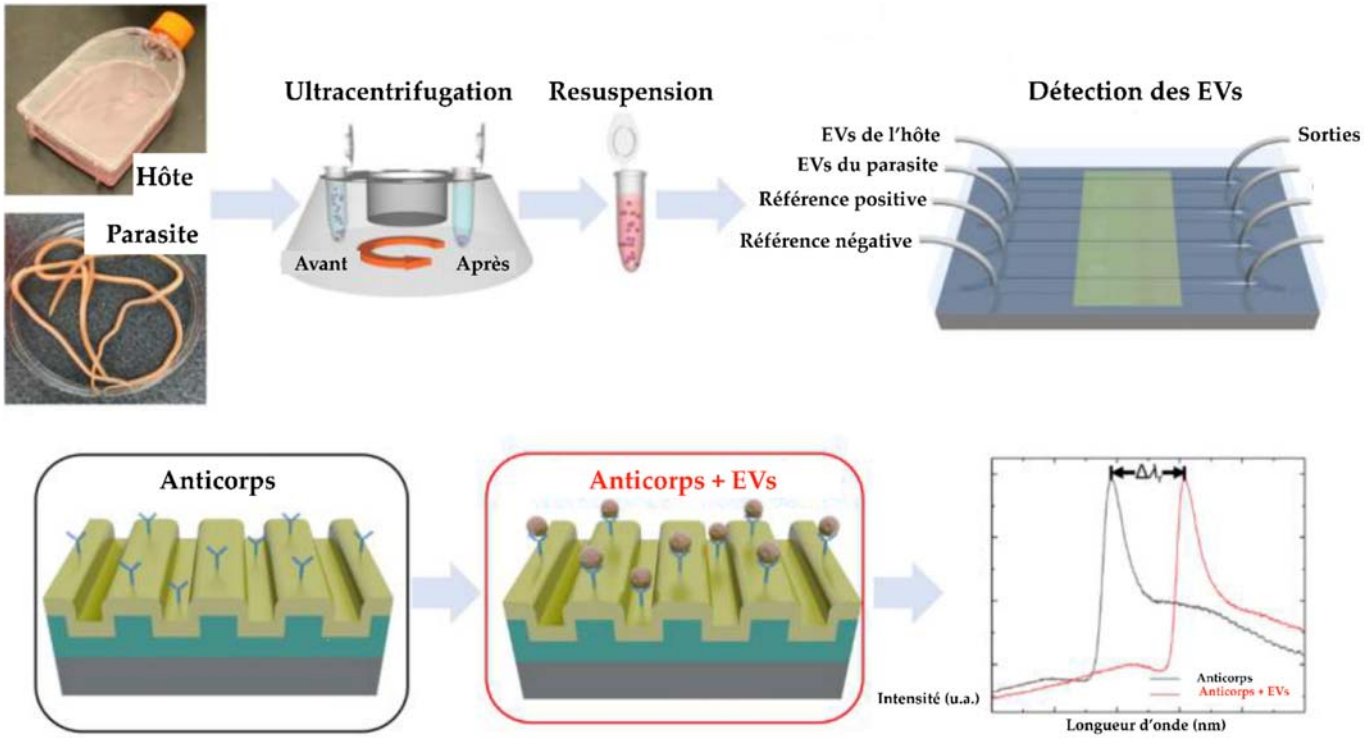


Figure 1.12 : Principe schématique de la différenciation des EVs de l'hôte et du parasite dans une puce microfluidique fonctionnalisée par des anticorps anti-CD63 couplée à un biocapteur à cristaux photoniques. Le signal de liaison des EVs correspond au décalage spectral Δλr, adapté de Wang et al. [273].

Reátegui *et al.*[274] ont proposé un dispositif fluidique fonctionnalisé avec des anticorps dirigés contre les biomarqueurs du cancer pour capturer les EVs dérivées de tumeurs. Ils ont conçu une surface en chevrons pour favoriser le nombre d'interactions entre les EVs et le revêtement d'anticorps par le biais de micro-vortex. La LOD rapportée est de 1x10^5 EVs/mL. Ils ont également proposé une approche d'isolement des EVs basée sur la dissolution du support à l'aide de la protéinase K. Shao *et al.*[142] et Dudani *et al.*[275] ont fonctionnalisé des dispositifs microfluidiques avec des anticorps anti-CD63, anti-EpCAM et anti-EGFR et ont démontré que certaines des protéines exprimées par les EVs sont liées à l'origine de leur cellule parentale. L'objectif est que le ciblage de ces protéines rende possible un diagnostic spécifique et permette le fractionnement de différentes sous-populations d'EVs. Les deux plateformes citées ci-dessus ont une étape finale de PCR dans la chambre fluidique pour analyser l'ARN exosomal. Cet ARN, par les informations sur les protéines en cours de synthèse qu'il contient, reflète l'état des cellules parentales et peut également permettre le diagnostic de cancers.

- **De la plasmonique**

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique intéressante en termes de suivi de réponse en temps réel et de détection semi-quantitative d'objets biologiques. Un autre avantage de la détection

SPR est l'évaluation parallèle de différentes sondes sur la même surface simultanément. Comme décrit par Zhu *et al.*[225], les EVs ont été détectées avec six anticorps différents (anti-CD9, anti-CD63, anti-CD81, anti-CD41b, anti-EpCAM, anti-E-cadhérine). Deux autres articles similaires ont fait état d'une détection SPR pour détecter les EVs avec des anticorps anti-ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), anti-CD63 et anti-EGFR-vIII[244,276]. Un article a montré la possibilité de déterminer le niveau d'expression de l'ICAM-1 sur les EVs avec moins de 400 µL d'échantillon[244].

D'autres dispositifs de nano-plasmonique ont été mis au point[277], notamment celui décrit par Liang *et al.*[254]. En fonctionnalisant un micro-réseau avec des anticorps anti-CD81, les EVs ont été capturées puis détectées grâce à des anticorps anti-CD63 et anti-CD9 couplés à des nanosphères et des nanobâtonnets d'or facilement identifiables en plasmonique, comme le montre la *Figure 1.13*. Cette combinaison a produit un effet plasmon local qui a amélioré la sensibilité et la spécificité de la détection des EVs. Cette technique a été démontrée sur des EVs dérivées de cancer du pancréas et elle a surpassé les tests ELISA en termes de LOD, ne nécessitant que 1 µL d'échantillon biologique et 5 heures d'analyse, faisant de ce dispositif un outil de diagnostic prometteur. Ce dispostif est désormais en développement pour des applications commerciales.

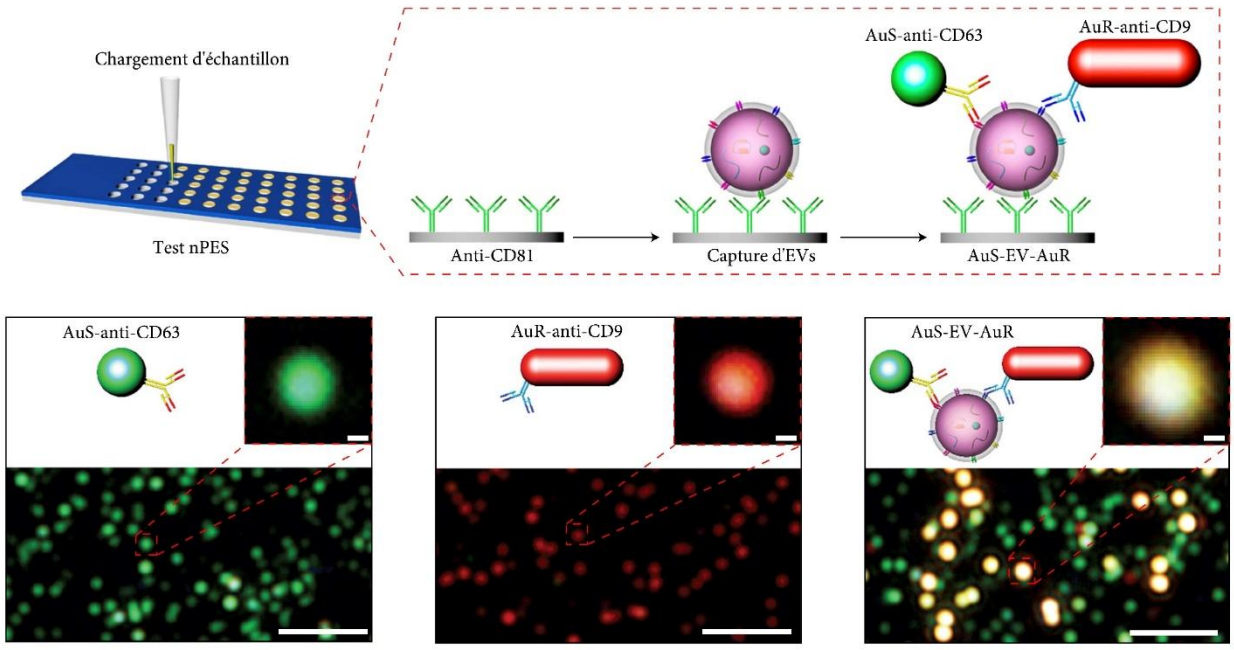


Figure 1.13 : Capture et détection des EVs à la surface d'un dispositif de diffusion renforcée par nanoplasmons (nPES) à l'aide d'anticorps dirigés contre les trois tétraspanines. Le signal est amplifié lorsque les proteins CD63 et CD9 sont présentes sur les EVs (signal jaune). Barres d'échelle : images principales, 2 µm ; images agrandies, 100 nm, adapté de Liang et al. [254].

- **De l'interférométrie**

Cette autre méthode de détection optique semble prometteuse en termes d'isolement et de caractérisation d'EVs sur puce. Pour rappel, l'interférométrie détecte des ondes lumineuses dont les variations sont induites par la reconnaissance de la sonde pour sa cible à la surface du biocapteur. Dans le cadre des EVs, elle a été mise au point par Daaboul *et al.*[226]. Le capteur d'imagerie par réflectance interférométrique à une seule particule s'adresse aux nano-objets, tels que les anticorps et les EVs, et à mesure que ces objets se superposent dans la puce, le signal de contraste est amélioré. Le comptage et le dimensionnement directs ainsi que le phénotypage multiplexé de différentes populations d'EVs ont été démontrés en utilisant des anticorps contre les tétraspanines et la protéine CD171. Il serait intéressant de mener d'autres études

comparatives de cette technique par rapport au NTA et aux analyses immunoprotéomiques pour en montrer le potentiel. Cette technologie fait l'objet d'une mise sur le marché par la société **Nanoview** (Boston, USA).

- **De l'électrochimie**

L'une des techniques de détection des EVs les plus sensibles de toutes les méthodes basées sur l'affinité des biomolécules a été décrite par Kilic *et al.*[278]. Un biocapteur de spectroscopie d'impédance électrochimique a été fonctionnalisé avec une fine couche de thiol auto-assemblée puis, de neutravidine et enfin d'anti-CD81 biotinylé. Cette surface du biocapteur a permis de capturer les EVs induites par l'hypoxie de cellules cancéreuses de lignée MCF-7. Par rapport à la détection classique des EVs par ELISA, ce dispositif électrochimique a permis d'obtenir une LOD de 77 EVs/mL, ce qui fait de cette méthode une référence, la plus faible LOD détectée dans les biocapteurs d'affinité pour les EVs.

Un compromis doit être fait sur la sensibilité des biocapteurs si l'on veut pouvoir détecter différentes cibles en parallèle. Cavallaro *et al.*[279] ont développé un biocapteur électrochimique pour la détection des EVs avec une LOD relativement élevée ($2{,}8 \times 10^8$ EVs/mL) mais avec un aspect cinétique intéressant. Un capillaire a été fonctionnalisé avec des anticorps en utilisant la stratégie silane/glutaraldéhyde. Le courant de flux (ΔIs) a été mesuré en continu et les changements du courant de flux dans le capillaire induits par l'immobilisation des EVs ont été suivis au fur et à mesure de l'écoulement de l'échantillon, comme le montre la *Figure 1.14*. Cette technique a permis de profiler en temps réel les marqueurs de surface des EVs. Les mesures ont révélé que la méthode était capable de détecter les modifications des niveaux d'expression des protéines membranaires (CD63 et EGFR). Plus récemment ces travaux ont été présentées à la conférence Biosensors 2021 et cette approche a permis de mettre en évidence l'intérêt de cibler les marqueurs EGFR et PD-L1 dans des échantillons de patients atteints de cancer des poumons.

Figure 1.14 : Immunocapture des EVs dans un capillaire fonctionnalisé pour la détection électrocinétique. La modification du courant de flux (ΔIs) est proportionnelle à la liaison des EVs, adapté de Cavallaro et al.[279].

2.c. Les limites des méthodes actuelles d'isolement, de caractérisation et de détection

Après l'exposé des différentes méthodes d'isolement, de caractérisation et de détection actuelles des EVs, nous avons vu que la standardisation et la reproductibilité sont les points faibles de ces méthodes comme

le rappelait l'ISEV en 2017[173]. En 2021, ce point faible est toujours d'actualité. Le choix des méthodes d'isolement est nécessairement fait en fonction du type d'étude des EVs que l'on vise : analyse des protéines membranaires, profil ARN … En effet, les résultats d'analyse en aval de l'isolement peuvent varier en fonction de la méthode de purification choisie[180,280]. Finalement, le monde des biocapteurs s'étend à la détection des EVs par différentes méthodes permettant de s'adapter en fonction de la complexité de l'échantillon biologique. Ce domaine utilise conventionnellement des anticorps comme sondes mais des biomolécules alternatives existent : les aptamères. Ces derniers sont des oligonucléotides synthétiques sélectionnés pour leur affinité pour une cible d'intérêt. Leur double rôle : à la fois de sonde mais aussi brin d'ADN est une qualité attrayante dans le cadre de bio-objets tels que les EVs. Les possibilités de relargage contrôlé des EVs après capture par les aptamères sont nombreuses[281–283]. Le monde des aptamères sera plus largement exposé dans le **chapitre 3**.

Partie 2 : La microfluidique pour la préparation d'échantillons biologiques : vers l'utilisation du principe de déplacement latéral déterministe de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique

La seconde partie de ce chapitre s'intéresse au développement des méthodes basées sur la microfluidique pour le tri d'EVs. Le principe de tri en taille par Déplacement Latéral Déterministe sera présenté d'un point de vue théorique puis applicatif allant du tri biologique micrométrique vers le tri nanométrique à destination des EVs.

1. Émergence des méthodes microfluidiques pour l'isolement de vésicules extracellulaires

L'essor de la microfluidique depuis une vingtaine d'années change l'envergure des dispositifs diagnostiques *point-of-care* (POC). Un système POC est un dispositif de diagnostic utilisable au chevet du patient. En effet, la microfluidique permet la détection et la gestion des fluides à l'échelle du composant ; la sensibilité et la spécificité sont amplifiées pour détecter les analytes cibles dans de faibles volumes permettant de surmonter des difficultés techniques rencontrées lors de l'utilisation des dispositifs POC traditionnels[284], en évitant la nécessité de manipulation par un technicien qualifié par exemple. Les acteurs industriels majeurs dans le monde des sytèmes POC sont **Roche Diagnostics** ; **Abott** ; **Siemens Healthcare**, **BioMérieux**, **Beckton Dickinson**, **BioRad** … Ils génèrent à eux seuls 70% des revenus liés au diagnostic avec entre 1 et 5 milliards de dollars de revenus par entreprise par an. Aujourd'hui, la majorité des systèmes POC est dédiée au suivi du glucose dans le sang, aux gaz du sang et au suivi des biomarqueurs cardiaques[285]. Quelques exemples de systèmes de diagnostic commerciaux peuvent être cités comme le FilmArray® de **BioMérieux** permettant de détecter des virus respiratoires notamment à partir de fluides biologiques ; le système Afinion® d'**Abbott** pour le suivi du diabète à partir d'un échantillon d'urine ou de sang total ou encore le Xprecia Stride® de **Siemens Healthcare** pour analyser la coagulation sanguine. À l'opposé, de nombreuses start-up émergent des laboratoires afin de commercialiser de nouveaux systèmes microfluidiques de diagnostic. Par exemple, **10X Genomics** (Pleasanton, USA) est une start-up californienne à croissance exponentielle proposant l'analyse de cellule unique en utilisant de la microfluidique à gouttelettes. En France et dans le bassin grenoblois, deux start-up proposent des systèmes fluidiques POC intéressants : **Avalun** (LabPad®) et **MagIA diagnostics**. Le premier permet l'analyse de la coagulation sanguine de patients par suivi des taux de glycémie, de cholestérol …, tandis que le second développe une technologie visant à détecter des maladies infectieuses, fléaux des pays en voie de développement, telles que l'hépatite C et le virus du VIH. Cependant, seulement 3% des POC sont commercialisés pour la détection de marqueurs tumoraux[285]. Ceci reflète le manque de systèmes de diagnostic pour la détection simple de biomarqueurs cancéreux. Dans ce contexte, de nombreuses équipes de recherches travaillent à l'isolement et la détection d'EVs par des systèmes fluidiques[286–291]. Les avantages des systèmes microfluidiques pour l'isolement, la détection et le diagnostic sont nombreux et en particulier pour de faible volume d'échantillon. La grande concentration des EVs des liquides biologiques[141] (10^{12} EVs/mL de plasma) rend compatible l'isolement et la détection de ces objets biologiques par des sytèmes microfluidiques.

L'équipe de Mehmet Toner a décrit en 2010 le premier dispositif fluidique[292] constitué d'un canal fonctionnalisé par des anticorps. Il permet la capture d'EVs à partir d'anticorps puis l'analyse par

extraction du contenu en ARN à partir d'un échantillon biologique. Cependant l'isolement d'EVs fonctionnelles n'a pas été clairement réalisé. Des méthodes classiques de microfluidique comme le « filtre en H »[293] (*Figure 1.15*) et le fractionnement asymétrique du champ de flux (AF4)[294] sont possibles. Toutefois, l'utilisation du système en « filtre en H » pour le tri de particules de diamètre de 100 à 200 nm s'avère impossible sans l'utilisation d'une composante immunologique pour l'accroche spécifique des EVs tandis que le tri d'EVs par AF4 aboutit à une population très hétérogène et contient des impuretés protéiques[293,294]. L'utilisation d'ondes acoustiques dans un système microfluidique est une alternative intéressante pour l'isolement en taille d'EVs. Une équipe a developpé un dispositif permettant l'isolement d'exosomes à partir d'un échantillon sanguin par retrait progressif des cellules sanguines puis des microvésicules et corps apoptotiques en augmentant la fréquence des ondes[295] (*Figure 1.15*). Trois autres articles différents décrivent la purification d'EVs à partir d'échantillon biologique complexe tel que le sang[296–298]. Les travaux de l'équipe de Thomas Laurell ont notamment donné lieu à un système d'isolement d'EVs commercial : Acoutrap® (**Acousort**, Lund, Suède).

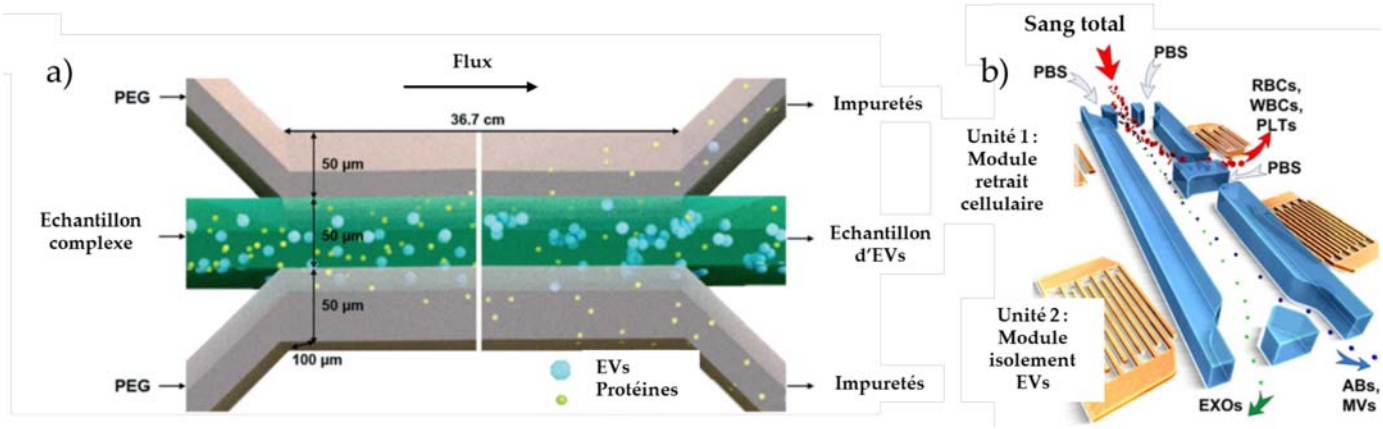


Figure 1.15 : a) Schéma de principe de l'isolement d'EVs par filtre en H[293] à partir d'un échantillon pré-purifié d'EVs de plasma. b) Schéma décrivant le système microfluidique assisté par ondes acoustiques[295] pour l'isolement d'EVs à partir d'un échantillon de sang total, adapté de Han et al. et Wu et al.[293,295].

La microstructuration du canal microfluidique est une dernière option intéressante. Des canaux disposant de chambres à piliers ont été utilisés pour l'isolement de nanoparticules lipidiques à partir d'un mélange complexe[299]. Ce principe de tri a été validé par l'ajout d'anticorps anti-CD63 pour cibler spécifiquement les EVs et réaliser un tri avec une pureté d'échantillon satisfaisante. Cependant le temps de relargage post-capture des EVs, réalisé dans un bain à ultrasons, est long (environ 8 heures). Le tri d'EVs en taille a aussi été réalisé en utilisant le principe de Déplacement Latéral Déterministe (DLD) par des scientifiques d'**IBM** grâce à une chambre à piliers désorientés[5,300]. Permettant d'opérer un tri en taille de sous-populations d'EVs, cette méthode est une alternative de séparation passive.

2. Principe du Déplacement Latéral Déterministe (DLD)

2.a. Principe de séparation

Le Déplacement Latéral Déterministe (DLD) est une technique microfluidique de séparation en taille de particules, basée sur l'écoulement d'un fluide en régime laminaire dans un réseau de piliers désorienté par rapport à la direction du flux.

Comme conceptualisé par Huang *et al.*[301] et affiné par Davis *et al.*[302], on peut considérer le dispositif DLD comme un réseau d'obstacles, dans lequel le fluide s'écoule : à chaque pilier-obstacle, une partie du fluide s'écoule à droite du pilier, et une autre partie du fluide s'écoule à gauche. On peut aussi diviser le flux en d'autant de lignes que le réseau de piliers comporte de piliers sur une période (trois lignes de flux et période = 3 dans la *Figure 1.16b*).

Le réseau de piliers formant le système DLD est désorienté et dispose de paramètres géométriques propres (G : espace interpiliers, θ : angle de déviation du réseau de piliers par rapport à la direction du flux, *Figure 1.16*). Ces paramètres géométriques permettent l'établissement d'un diamètre de coupure empirique, noté D_c : les particules de taille inférieure suivent les lignes de flux (particules bleues, *Figure 1.16a*) et elles adoptent une trajectoire en zigzag dans le réseau de piliers et se déplacent sans être déviées vis-à-vis du flux. En revanche, les plus grandes particules sont déviées par le réseau de piliers. En effet, dans ce cas, la particule est trop large pour rester dans la première ligne de flux et va « rebondir » sur chaque pilier et être déviée selon la désorientation du réseau (*Figure 1.16a*). Ce mode est appelé « mode de déplacement ». La valeur du D_c correspond à deux fois la largeur de la première ligne de flux, dépendant elle-même de la désorientation du réseau[303]. Cette désorientation du réseau est définie comme l'angle correspondant au nombre de rangées de piliers nécessaire avant de revenir à la configuration initiale (égale à une période). Cette périodicité est dénommée N. Depuis les débuts des systèmes DLD, différents modèles ont été établis pour estimer le D_c[302–305]. La formule communément adoptée est empirique et elle est issue des travaux de Davis : $D_c = 1{,}4G \tan\theta^{0{,}48}$.

Figure 1.16 : a) Définition du réseau de piliers DLD avec G l'espace interpiliers bord à bord et θ l'angle de déviation du réseau de piliers par rapport au flux ; b) Sur l'agrandissement, schéma des lignes de flux à travers le réseau, adapté de Davis et al.[302].

Il est donc possible de définir un réseau DLD avec une taille de diamètre critique souhaitée, en prenant en compte la définition des paramètres géométriques du réseau DLD, comprenant l'écart interpiliers G, l'angle de déviation du réseau θ et N la période.

2.b. Choix du *design*

La conception d'un système DLD nécessite le *design* de la géométrie du réseau de piliers. Selon l'application visée, il est possible de jouer sur plusieurs paramètres.

2.b.i. Diamètre de coupure

Plusieurs modèles théoriques et empiriques ont été proposés afin d'estimer le diamètre critique. Inglis *et al.* ont développé le diamètre critique théorique de la séparation, défini comme égal à deux fois la largeur de la première ligne de flux[303] : $D_C = 2\beta$. Ce modèle prédit approximativement le déplacement des particules entre le mode zigzag et le mode de déplacement. Cependant, il sous-estime la valeur expérimentale du D_c, telle que posée par Davis *et al.*[302]. Cette équation a été validée par différents tests de séparation des particules pour de nombreux systèmes avec des désorientations différentes :

$$D_C = 1{,}4G \tan\theta^{0{,}48}$$

où θ est l'angle d'inclinaison du réseau par rapport à la direction du flux. Cette formule empirique a été utilisée pour la conception de divers dispositifs DLD[5,306–308]. D'autres modèles ont été décrits et sont plus largement exposés dans la thèse d'Eloïse Pariset[309].

2.b.ii. Exemples de designs de DLD

La conception à D_c unique permet de séparer les particules dans un mode binaire en se basant sur un réseau uniforme tout au long du canal. La disposition de ce *design* DLD est généralement deux entrées qui comprennent une entrée de l'échantillon et une entrée de tampon comme schématisé sur la *Figure 1.17a*. La majorité des systèmes DLD développés est basée sur cette conception[310–312] et permet une séparation binaire des particules dans deux sorties distinctes. Un autre type de *design* DLD pour la séparation en fonction d'un seul D_c peut être établi en utilisant un système concentrateur en miroir (symétrisé). Il comprend deux réseaux de piliers symétrisés séparés par un mur central comme décrit sur la *Figure 1.17b*. Les particules de taille supérieure au D_c sont déviées et concentrées au centre, tandis que le reste des particules s'écoule en zigzag. En utilisant la conception symétrisée, il est par ailleurs possible de concentrer les particules en ajustant le volume de collecte en sortie[313]. Expérimentalement, des cellules immunitaires (Jurkat) ont été déviées et concentrées d'un facteur 50[313]. Chaque conception a une caractéristique de gamme dynamique, qui est le rapport du plus grand D_c qui peut être séparé sans obstruction jusqu'au plus petit D_c dans le système. Le *design* de système de D_c multiple comprend une région condensatrice et une région de tri qui sont capables de concentrer des particules polydisperses puis de les séparer dans la zone de tri respectivement (*Figure 1.17c*)[305].

La définition d'une dimension interpiliers spécifique pour générer un certain D_c implique que dans un réseau de séparation binaire des particules de taille supérieure à cette distance interpiliers peuvent entrainer un bouchage du dispositif, et cela d'autant plus que l'échantillon d'entrée est complexe et concentré. Pour contrer cela, une séparation de taille multiple avec un composant DLD peut être appliquée par des différents systèmes : tri successif ou tri en cascade (*Figure 1.17 d à e*). Le dispositif de tri successif a généralement la même distance interpiliers, mais différents angles de désorientation du réseau le long du canal qui permettent la séparation continue des polydisperses particules en diminuant le colmatage, comme le montre la *Figure 1.17d*. Dans le système de tri en cascade, la distance interpiliers et l'angle de déviation sont modifiés le long du réseau et il existe des canaux latéraux supplémentaires pour collecter les particules séparées de chaque région correspondant à un D_c donné (*Figure 1.17e*). Pour concevoir un

réseau en cascade, la résistance des canaux latéraux doit être comparable à la résistance du canal principal afin de fournir le même débit à chaque canal. La faisabilité technique et l'équilibre hydrodynamique sont des paramètres limitants au développement de ces compostants DLD à D_c multiples pouvant expliquer l'absence d'applications expérimentales biologiques. Et concrétement, ces dispositifs sont également plus compliqués à fabriquer car les procédés de gravure sont dépendants de la densité du réseau de piliers.

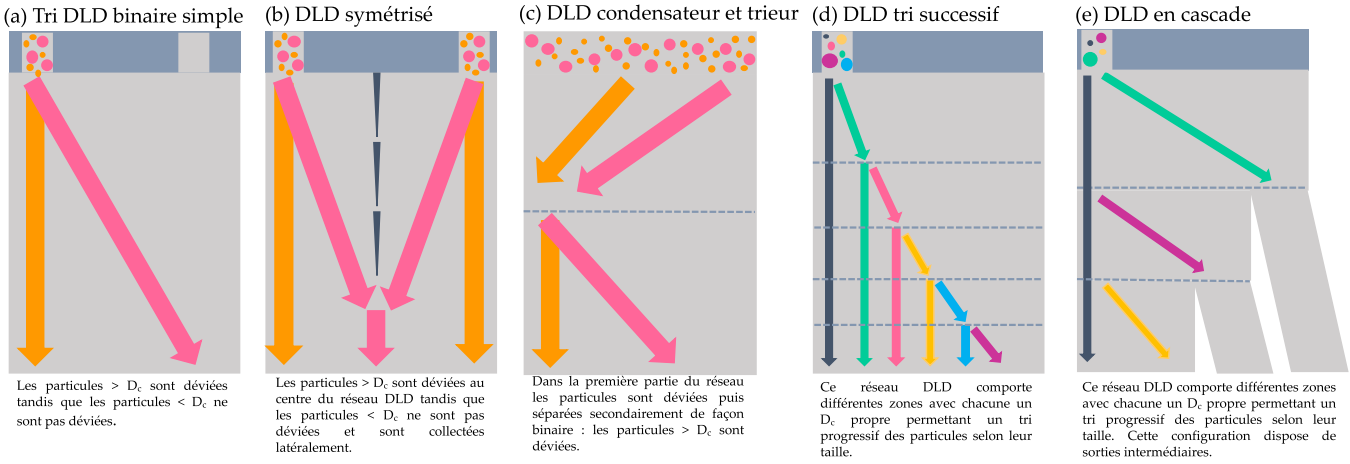


Figure 1.17 : Différents systèmes DLD pour la séparation binaire et multiple, a) design pour tri binaire simple, b) réseau DLD symétrisé c) système DLD condensateur-trieur, d) système DLD de tri successif, e) système DLD en cascade. Dans toutes les configurations de DLD présentées, l'échantillon est injecté en entrée dans la partie supérieure et collecté en sortie dans la partie inférieure.

Au-delà de la conception d'un système à D_c multiple, la mise en série de plusieurs dispositifs DLD est un aspect possible. Le réseau en cascade peut également être conçu comme un dispositif modulaire qui peut être combiné en série ou en parallèle pour la séparation de particules. Pariset *et al.* ont démontré la déviation successive de trois tailles de cellules différentes : des cellules cancéreuses de la prostate, des globules rouges et des bactéries[307]. Enfin, d'autres aspects peuvent être employés pour concevoir un système DLD. Un de ceux-là est la forme des piliers[314,315]. Étudiée par Hyun *et al.*, une forme de pilier avec un espacement plus important entre les piliers a permis de diminuer la résistance fluidique pour un D_c donné[316]. La forme des piliers est un paramètre que le CEA Leti a précédemment étudié sur des systèmes DLD de tri micrométriques[317] mais qui n'a pas fait de réelles preuves d'intérêt d'un point de vue expérimental.

2.c. Défis liés à la conception de systèmes microfluidiques DLD

Il existe des défis liés en particulier au risque de bouchage, mais aussi à la variété de la forme des objets. Plusieurs solutions et alternatives ont été développées afin de permettre une séparation efficace des particules.

2.c.i. Limiter le bouchage

Une première stratégie concernant la limitation du bouchage du composant DLD a consisté à densifier progressivement le composant silicium. Ainsi, des murets ont été introduits entre les entrées et les sorties et le réseau de piliers lui-même[304,307]. De plus, des problèmes de bouchage ont aussi été évités en utilisant des gouttelettes d'eau déposées dans le canal pour remplacer les piliers rigides[318]. Les particules ont été injectées dans une phase huileuse non miscible et séparées par les piliers de gouttelettes. Ce nouveau concept présente l'avantage de permettre des conceptions de DLD entièrement renouvelables et

reconfigurables. Cependant, pour le tri d'échantillons biologiques tels que les EVs, cette méthode apparaît compliquée à mettre en œuvre.

2.c.ii. Séparer des objets biologiques non sphériques

Parce que les objets n'ont pas tous une forme sphérique, des systèmes DLD ont été adaptés pour faire face à cela. Par exemple, les globules rouges ont une forme de disque biconcave tandis que les bactéries de types coques s'assemblent facilement sous forme de chaîne. Des optimisations sur la hauteur du canal ont été réalisées et ont permis de discriminer un échantillon de sang contenant des parasites de type trypanosome dans un objectif de diagnostic. Ceci alors que ces deux objets biologiques disposent d'une largeur équivalente (2,5 µm) mais de longueurs différentes (7,5 µm *versus* 30 µm)[310]. Par ailleurs, des optimisations de forme de piliers ont été réalisées afin de trier efficacement les globules rouges des autres cellules sanguines. Les formes de piliers en I et en L ont permis la séparation la plus efficace des globules rouges en induisant l'orientation des cellules d'intérêt[314]. Finalement, les bactéries à coque (mono-, bi- et chaîne) ont pu être résolues par un système DLD[308]. Isoler des sous-populations de bactéries permet notamment d'évaluer leur virulence. Ainsi, comme de nombreux objets biologiques ne sont pas sphériques, il est important d'appréhender la conception des sytèmes DLD en fonction de l'application visée. Actuellement, les défis de tri de particules biologiques non-sphériques sont réalisés pour des objets de taille micrométrique. Les EVs ne sont *a priori* pas toujours sphériques et il est intéressant de garder à l'esprit ce *challenge* dans les années à venir.

2.c.iii. Combiner les systèmes DLD avec d'autres forces physiques

Des améliorations de l'efficacité de la séparation des DLD ont été apportées en combinant un système DLD avec la diélectrophorèse[319] ou les milieux ioniques environnants[320]. De plus, la gravité peut être utilisée comme force motrice pour injecter le fluide dans le dispositif DLD[321,322] et les piliers peuvent être complétés par un champ de force généré par un couplage entre les forces acoustiques et diélectrophorétiques[323]. L'ajout d'un champ électrique dans le canal DLD est une approche qui est apparue à plusieurs reprises lors du congrès microTAS 2020 et qui permet avec un réseau DLD micrométrique d'atteindre des diamètres de coupure nanométriques[324]. Cette méthode est bien plus abordable technologiquement parlant que les réseaux DLD nano-structurés. En effet, ces derniers requièrent l'utilisation d'équipements de micro-électronique de très haute précision pour leur conception.

3. Applications : Le tri de particules biologiques micrométriques …

3.a. Cellules sanguines

Le sang est le fluide biologique de référence pour la biopsie liquide. De nombreuses publications portant sur l'extraction de cellules d'intérêt du sang ont été réalisées. Le premier article scientifique rapportant l'utilisation d'un système DLD pour le tri d'un échantillon biologique date de 2006. Davis *et al.* ont démontré la séparation des globules blancs et rouges en utilisant un système avec un D_c adéquat d'environ 9 µm. 99,6% des leucocytes ont été déviés quand 99% des érythrocytes ne l'ont pas été. Dans un second temps, un autre système DLD a été utilisé pour démontrer la préparation de plasma à partir d'un échantillon de sang avec un débit de 0,4 µL/min[302]. La même équipe a démontré en 2008 l'isolement et la caractérisation de plaquettes en utilisant un dispositif DLD couplé à une détection à base d'anticorps[325]. D'autres systèmes similaires fleurissent suite à cette publication[326–328], comme Huang *et al.* qui ont décrit en 2008 un système DLD permettant de concentrer de 10 à 20% les érythrocytes nucléés présents dans les échantillons sanguins de femmes enceintes, ce qui peut être intéressant pour le diagnostic de maladie chez l'embryon. Quelques années plus tard, d'autres méthodes d'enrichissement basées sur la DLD ont été développées[329,330]. L'équipe d'Inglis a réalisé un progrès notable en termes de débit pour la concentration de leucocytes en vue d'analyses biomédicales en enrichissant de dix fois la concentration en leucocytes avec un débit de 115 µL/min en parallélisant six composants DLD en 2011[329]. La forme de DLD mirorée permettant la concentration des particules déviées montre tout son intérêt pour l'enrichissement de plasma en vue de la détection de myélomes[330]. La conception en miroir a permis aussi le développement d'une préparation automatisée de leucocytes humains pour la cytométrie de flux avec un taux de récupération de 88% pour les globules blancs et une séparation de plus de 99,9% des globules rouges[331]. Enfin, des systèmes avec des espaces assymétriques ont été développés pour une amplification de la déviation des particules d'intérêt : globules rouges, leucocytes et monocytes afin d'obtenir des échantillons mieux définis en sortie de DLD[332,333].

3.b. Cellules Tumorales Circulantes

Les Cellules Tumorales Circulantes (CTCs) sont des cellules provenant des métastases tumorales circulants dans les liquides biologiques pour rejoindre des foyers métastatiques. Leur potentiel de biomarqueurs est grandissant pour les applications de diagnostic mais en raison de leur très faible concentration dans le sang[334], ces cellules sont difficiles à isoler. Par leur grande taille (9 à 30 µm)[334], ces cellules peuvent être séparées des cellules sanguines par un système de tri de type DLD[335]. Zhou *et al.* ont développé un système DLD à flux multiples pour l'isolement sans marquage de CTCs. 93 % des CTCs sont isolées à partir de cellules en culture tandis que sur les échantillons patients, ils ont réussi à isoler des CTCs chez six personnes sur huit atteintes d'un cancer du poumon[336]. Une autre stratégie microfluidique pour l'isolement et l'analyse de la déformabilité des CTCs a été rapportée. Avec une puce microfluidique intégrant deux modules : l'un des modules est un réseau de DLD symétrisé pour la déplétion des cellules sanguines ; l'autre module est un autre réseau DLD avec un angle d'inclinaison croissant pour la séparation des CTCs en fonction de leur taille et de leur déformabilité. La puce permet l'isolement des CTCs avec un rendement d'isolement supérieur à 90%[337]. Enfin, certaines CTCs se déplacent dans le sang sous forme de *clusters* initiant la formation de nouvelles tumeurs métastatiques. Afin de pouvoir identifier les potentielles nouvelles tumeurs formées par ces *clusters* de CTCs, l'équipe de Memhet Toner a

développé un système de tri DLD des clusters de CTCs en deux étapes par séparation en fonction de la taille et de l'assymétrie des cellules[306]. A la fin de la première étape de DLD, les grands clusters de CTCs sont isolés tandis que les plus petits sont isolés à la fin de la seconde étape. L'isolement de clusters de CTCs à partir de sang permet d'envisager des avancées majeures dans la compréhension et le traitement des cancers métastatiques.

3.c. Bactéries

Dans le cadre d'infection bactérienne, l'identification des bactéries s'avère être une étape déterminante pour la mise en place d'un traitement adapté. De plus, certains paramètres morphologiques des bactéries comme la longueur de la bactérie, la présence de capside sont connus pour être des facteurs de virulence. Dans ce contexte, Beech et *al.* ont utilisé un système DLD permettant de séparer des bactéries de type *Spectrococcus pneumonia* en fonction de la longueur de la chaine (unicoque, bicoque ou chaine) à partir d'une solution tampon[308]. Dans une optique similaire, l'équipe de Tegenfeldt a utilisé la DLD afin de proposer un système de diagnostic des maladies parasitaires à bas coût, simple d'utilisation et disponible dans des pays en voie de développement[338]. Ce système permet le tri de particules de tailles et morphologies différentes (globules rouges, globules blancs et parasite). Enfin, l'isolement de spores de type *Aspergillus*, industriellement important pour la bioproduction, a été réalisé à hauteur de 99 % à partir d'un échantillon concentré à $4x10^6$ spores/mL[311].

4. Applications : les défis du tri de particules biologiques nanométriques

Un dernier défi des systèmes DLD, non discuté dans les paragraphes précédents, réside dans l'application de ce principe à l'échelle nanométrique.

4.a. Vésicules extracellulaires

Comme démontré précédemment dans ce manuscrit, les vésicules extracellulaires font l'objet d'une attention particulière comme biomarqueurs prometteurs. Dans ce cadre, des équipes ont étudié différents systèmes DLD pour l'isolement de ces objets biologiques de petite taille[339,340]. En parallèle des chercheurs américains, ont développé en 2016, un système DLD au dimensionnement nanométrique permettant la séparation de particules jusqu'à 20 nm[300] et permettant l'isolement uniquement d'exosomes parmi les classes d'EVs. Le système DLD au réseau nanométrique, bien que très puissante en termes de séparation, implique un débit extrêmement faible de tri de l'échantillon (dizaine de µL/h). En 2018, Smith *et al.* ont intégré jusqu'à 1 024 canaux DLD en parallèle pour permettre l'isolement d'EVs à partir d'échantillons cliniques[5]. Plus récemment, la même équipe a parallélisé plus de 30 000 composants DLD permettant d'atteindre des débits de plusieurs mL/heure et rendant les composants DLD prometteurs pour la standardisation de l'isolement des EVs, mais relativement fastidieux d'utilisation.

4.b. Virus

Les virus par leur taille nanométrique peuvent se prêter à l'isolement par des systèmes DLD. À ce jour, aucun article scientifique ne décrit la séparation de particules virales. Mais le sujet paraît cependant prometteur : un projet européen dénommé VIRUSCAN porte sur l'isolement de virus par DLD avant leur analyse par spectrométrie de masse. De plus, dans une récente revue, un consortium de pionniers de l'application aux particules biologiques du principe DLD suggère aussi que l'isolement de virus par ces systèmes DLD est à explorer[341].

4.c. Protéines

Le développement de systèmes DLD nanométriques rend envisageable l'utilisation de ce principe pour l'isolement d'acides nucléiques et de protéines. Des séquences d'ADN sont séparées par DLD[342,343]. Les limites des systèmes nanométriques des dispositifs DLD sont effectives. Bien que des preuves de concept soient publiées, les débits très faibles imposés par la grande résistivité des réseaux DLD rendent compliquée leur utilisation à plus grande échelle. Une solution pour remédier à cela peut être la parallélisation des réseaux ; cependant, la complexité de l'intégration fluidique de puces parallélisables reste un frein important. Zeming *et al.* ont démontré qu'il est possible de purifier les EVs des contaminants protéiques de taille similaire comme les lipoprotéines et l'albumine (~ 50-70 kDa). En utilisant des billes substrats, cette approche pourrait en partie résoudre les faibles débits imposés par les DLD nanométriques[344].

En conclusion de cette seconde partie, l'intérêt des systèmes DLD micro-ciblés pour les bio-analyses n'est plus à démontrer. Un grand nombre d'applications a été proposé permettant d'envisager sereinement la montée en puissance de cette technologie de préparation d'échantillon. Le passage du monde micrométrique à nanométrique engendre un défi technologique important dans le monde de systèmes DLD. Depuis environ cinq ans, des démonstrations de tri d'objets biologiques nanométriques en utilisant le principe de DLD sont proposées et mettent en évidence l'intérêt de tels systèmes dans le monde du diagnostic. Bien que performantes en termes de tri en taille, ces méthodes requièrent des moyens considérables. Le système DLD nano-ciblé, disposant d'un D_c nanométrique, comporte de réelles limitations : débit du fluide, fabrication et fonctionnalité des puces et facilité de mise en œuvre. Une alternative réside dans l'utilisation de billes supports ciblant la population de choix pour fictivement augmenter la taille des particules d'intérêt. Cette approche permettrait de conserver des conditions fluidiques raisonnables en termes de débit et de volume traité. Les pionniers de la DLD tels que Beech, Smith, Tegenfeldt, Wunsch et Inglis ont rédigé une revue en 2020 pour mieux appréhender ces défis de façon à débloquer ces contraintes et révéler le potentiel des systèmes DLD nano-ciblés dans les années à venir[341]. Finalement, un point non soulevé mais tout aussi novateur réside dans la conception de DLD disposant d'espaces inter-piliers relativement larges (µm) mais permettant tout de même d'accéder à des D_c de l'ordre de quelques centaines de nm. En limitant les contraintes relatives aux réseaux DLD nanométriques, l'accès au tri de particules biologiques nanométriques par DLD apparaît alors possible.

Dans la suite de ce manuscrit, la nomenclature adoptée pour décrire les systèmes DLD sera comme suit :

- un système DLD micro-ciblé est un système disposant d'un diamètre de coupure micrométrique
- un système DLD nano-ciblé est un système disposant d'un diamètre de coupure nanométrique.

Partie 3 : Définition du projet de thèse

Dans un échantillon sanguin issu d'une biopsie liquide, trois classes d'objets biologiques peuvent apporter des informations diagnostiques : les cellules tumorales circulantes, l'ADN tumoral circulant et les vésicules extracellulaires. Les cancers représentent à eux seuls l'une des causes principales de décès dans le monde et afin de prévenir toujours plus tôt ce type de maladie, les cliniciens sont à la recherche d'instruments diagnostiques innovants et performants. C'est pourquoi, les scientifiques et les industriels mettent œuvre de nouvelles techniques de détection de biomarqueurs. La biopsie liquide est une approche attractive pour le diagnostic médical actuel.

Dans ce cadre, les EVs par leur nature apparaissent depuis une décennie comme une nouvelle classe de biomarqueurs extrêmement prometteurs. Cependant, les techniques actuelles d'isolement de ces nanoparticules biologiques sont coûteuses en échantillon biologique, requièrent un savoir-faire important, manquent de reproductibilité et sont donc difficilement applicables en clinique. Ce premier chapitre avait pour objectif de présenter les vésicules extracellulaires, leurs fonctions physiologiques et pathologiques afin de mettre en avant le potentiel diagnostique de ces objets biologiques, nouvelles sentinelles d'information pour le suivi de la santé humaine. Ainsi, les investigations pour l'utilisation des EVs comme biomarqueurs sont limitées par les outils technologiques actuellement disponibles et c'est l'un des enjeux de cette thèse que de contribuer à développer une technologie adéquate.

Les EVs comportent de nombreuses cibles spécifiques à leur surface. Ainsi, cibler ces protéines d'intérêt (CD63, EpCAM par exemple) est une manière spécifique de capturer ces nanoparticules biologiques. Classiquement, le tri biomarqueur-spécifique s'opère par les anticorps mais ceux-ci ne permettent pas un relargage contrôlé des cibles. Des sondes synthétiques telles que les aptamères, stables, peu coûteuses, spécifiques et simples d'utilisation offrent des fonctions de capture équivalentes. En plus d'être des sondes spécifiques des protéines à la surface des EVs, les aptamères sont des monobrins d'oligonucléotides d'ADN, propriété qui leur confère une structure en double hélice en présence de leur brin complémentaire. La double structure possible des aptamères (sonde ou double hélice) permet d'envisager un relargage contrôlé des sondes d'intérêt. Travailler à l'utilisation d'aptamères pour cibler des EVs apparaît alors comme un moyen intéressant pour permettre la capture et le relargage contrôlé en fonction de la protéine ciblée. Ce relargage est envisagé par ajout d'un brin complémentaire à l'aptamère modifiant l'équilibre conformationnel de l'aptamère et permettant le relargage d'EVs structurellement intégres. L'approche de la capture et relargage de sous-populations d'EVs en fonction des biomarqueurs d'intérêts par l'utilisation d'aptamères apparaît originale et prometteuse.

En parallèle, les alternatives microfluidiques proposées par les sytèmes *Lab-on-chip* et les avancées technologiques réalisées ces dernières années dans ce domaine permettent d'envisager les dispositifs microfluidiques comme des outils intéressants pour l'isolement des EVs. Ainsi, les systèmes microfluidiques de tri en taille reposant sur le principe de Déplacement Latéral Déterministe (DLD) sont des dispositifs de préparation d'échantillons biologiques prometteurs. De nombreuses applications en biologie ont déjà été démontrées à l'échelle micrométrique et transposer ce principe à l'échelle nanométrique sur des vésicules extracellulaires apparaît être un véritable défi scientifique à relever. Ainsi, disposant déjà de la technologie DLD à l'échelle micrométrique au laboratoire, l'investigation de systèmes DLD permettant l'isolement d'objets biologiques, tels que les EVs de quelques centaines de nanomètres,

est un axe de développement important qui nécessite des optimisations conséquentes. Cependant, se limiter au tri d'un échantillon en taille est loin d'être suffisant pour bénéficier entièrement des informations portées spécifiquement par les EVs.

Disposant, à la fois d'un outil de capture et de relargage contrôlé spécifique des EVs par les sondes aptamères et d'une technique prometteuse de tri en taille par la technologie DLD, la combinaison de ces méthodes apparaît comme une approche encourageante à explorer. Pour réaliser ce défi, la fonction « tri biomarqueur-spécifique » est implémentée dans le dispositif microfluidique DLD nano-ciblé par le développement d'une stratégie de chimie de surface adaptée au greffage de sondes aptamères.

Ainsi, le couplage du tri en taille associé à une sélection des EVs en fonction des marqueurs de surface suivi d'un décrochage sélectif et contrôlé des EVs est un projet novateur et prometteur en termes de diagnostic. Concevoir un unique système microfluidique d'isolement spécifique d'EVs d'intérêt est un défi scientifique qui permettrait de proposer une méthode robuste et standardisable d'analyse de ces nouveaux biomarqueurs répondant à l'appel de l'ISEV.

Pour adresser ce défi, ce travail de thèse a été articulé en plusieurs axes. L'étude de la capture des EVs par des anticorps ciblant des protéines membranaires vésiculaires est abordée et validée dans le **chapitre 2** puis transposée à des sondes nouvelle génération, les aptamères, dans le **chapitre 3**. Une fois l'approche de capture et relargage des EVs validée avec les aptamères, deux voies seront explorées. Les systèmes DLD micro-ciblés, développés au cours d'une thèse précédente au CEA Leti, seront employés pour isoler des billes utilisées comme support de capture spécifique des EVs, par une fonctionnalisation *via* les aptamères. Cette méthode, relativement simple à mettre en œuvre, démontre au **chapitre 4** l'intérêt de coupler le tri en taille à un tri par affinité grâce au ciblage de protéines d'intérêt. Enfin, afin de proposer un dispositif de diagnostic complet, le développement de systèmes DLD nano-ciblés sera développé dans le **chapitre 5** et mis en regard de la méthode conventionnelle d'isolement d'EVs, la centrifugation différentielle. Finalement, la combinaison DLD nano-ciblé et tri par affinité sera envisagée dans le **chapitre 6**, offrant des perspectives intéressantes pour des applications cliniques. Un schéma de synthèse du projet de thèse est présenté ci-après (*Figure 1.18*).

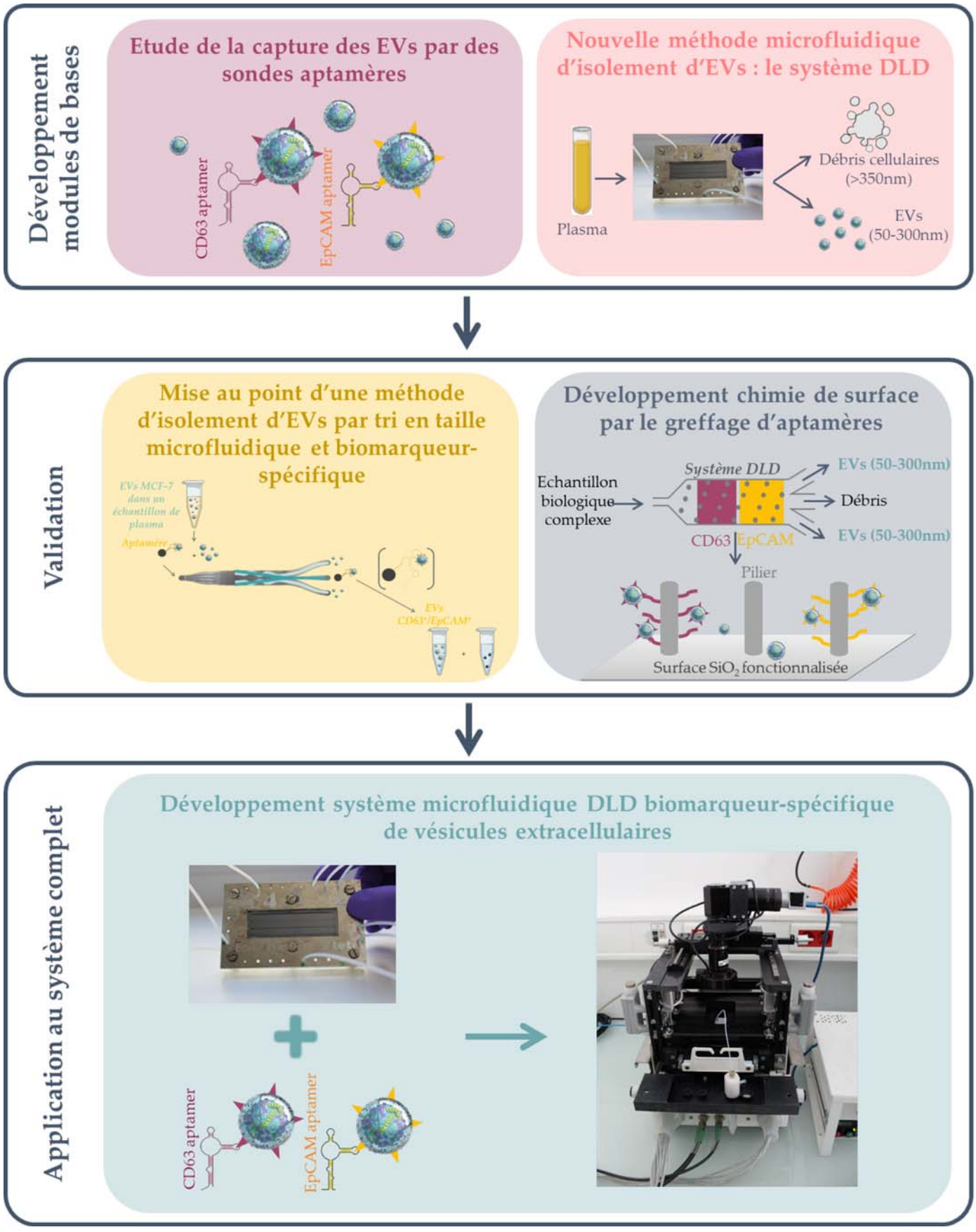


Figure 1.18 : Synthèse du plan de thèse.

Résumé – Les Vésicules extracellulaires : de nouveaux biomarqueurs

- Depuis une décennie, les vésicules extracellulaires (EVs) font l'objet d'un intérêt scientifique croissant en raison de leur fort potentiel de biomarqueurs à des fins diagnostiques.

- L'hétérogénéité des populations d'EVs rend leur isolement mais aussi leurs caractérisations physiques et biochimiques particulièrement complexes. En effet, il est indispensable de croiser différentes méthodes de caractérisations pour démontrer la présence et les propriétés des EVs. Les principaux protocoles d'isolement des EVs sont basés sur la centrifugation différentielle, les colonnes de chromatographie d'exclusion stérique et par l'utilisation d'agents commerciaux précipitants. Cependant, ces techniques sont encore laborieuses à appliquer. La standardisation des protocoles d'isolement est donc indispensable à l'utilisation des vésicules en clinique. Cela passe principalement par le développement de nouvelles méthodes standardisées et reproductibles pour l'isolement des EVs.

- L'utilisation d'aptamères comme sondes permet d'envisager une capture maitrisée par les marqueurs à la surface des EVs. Leur nature de brins d'ADN peut conférer aux aptamères une conformation structurelle tantôt en conformation d'aptamère tantôt en double hélice d'ADN. Ceci est une propriété intéressante pour permettre le relargage contrôlé d'EVs.

- Les techniques microfluidiques d'isolement apportent des solutions pour une préparation d'échantillon à partir de plus faibles volumes de liquide biologique, ainsi qu'une plus grande intégration des étapes d'isolement et de caractérisation dans un même dispositif. Les nouvelles propriétés de séparation qu'offre la microfluidique permettent d'envisager l'émergence d'instruments adaptés à la détection d'analytes cibles dans de faibles volumes pour des applications de diagnostic *point-of-care*. En particulier, le principe de séparation en taille par DLD offre un large champ d'applications pour le tri de particules biologiques d'intérêt dans un milieu complexe (des cellules tumorales circulantes aux vésicules extracellulaires).

- Ce sujet de thèse porte sur le développement d'un système microfluidique de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'isolement d'EVs d'intérêt. Il est organisé en différents axes : l'étude de la capture des EVs par des sondes aptamères, la mise au point d'une méthode microfluidique biomarqueur-spécifique d'isolement d'EVs, le développement d'un système DLD nano-ciblé pour l'isolement d'EVs et finalement le développement d'une stratégie de chimie de surface pour la fonctionnalisation du système DLD nano-ciblé par des aptamères.

Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de vésicules extracellulaires pour la validation de méthodes alternatives

Chapitre 2 – Isolement et caractérisation de vésicules extracellulaires

- La nécessité de développer une méthodologie fiable et compatible avec les moyens disponibles dans l'environnement de la thèse pour l'isolement et la caractérisation des EVs sera présentée.

- L'isolement des EVs à partir de deux lignées cellulaires (THP-1 et MCF-7) et par différentes méthodes (UC et SEC) sera présenté. Plusieurs techniques de caractérisations physiques seront testées et les avantages et inconvénients de chacune seront abordés. Un protocole standardisé sera choisi à la fois pour l'isolement et la caractérisation pour l'ensemble du projet de recherche. De plus, différents types cellulaires seront investigués afin de déterminer l'échantillon d'EVs le plus adéquat ainsi que sa conservation.

- Finalement, la caractérisation biochimique de différents types d'EVs (issues de milieux de culture et d'échantillon de sang) sera réalisée en commençant par une technique d'immunomarquage (*western blot*) puis en réalisant la capture et la détection d'EVs à travers différents biomarqueurs (CD63, CD81 et EpCAM) par deux types de test ELISA (direct et *sandwich*).

- Cela aboutira à la description du protocole d'isolement et de caractérisation des EVs retenu.

Dans ce chapitre, différentes méthodes d'isolement et de caractérisation d'EVs seront analysées. Un choix de protocole d'isolement standard sera fait. De plus, le système de caractérisation NTA sera calibré par des particules modèles de choix, différents types d'EVs seront analysés par ce système et comparés à la cryo-microscopie électronique. Finalement, la caractérisation protéique des échantillons d'EVs sera envisagée tout d'abord par WB à travers le développement de deux tests ELISA, direct et indirect.

L'étude des EVs passe nécessairement par l'isolement de ces nano-objets à partir d'un échantillon biologique complexe, tel que le milieu de culture cellulaire, un échantillon sanguin, de l'urine … Depuis le début de l'étude approfondie des EVs à la fin des années 1990, leur isolement est considéré comme l'étape clé permettant l'accès à un échantillon biologique adapté pour les expérimentations ultérieures[11]. Une des méthodes reines pour l'isolement de petites particules est l'ultracentrifugation. Ce type de centrifugation à très haute accélération va permettre de concentrer des objets nanométriques, comme les EVs. À partir d'un échantillon complexe contenant des particules biologiques allant d'une dizaine de micromètres à quelques dizaines de nanomètres de diamètre, le challenge est de taille. Il s'agit donc de faire précipiter progressivement par centrifugation graduelle (différentielle) les particules les plus grosses pour accéder à la dernière étape à un échantillon d'EVs très enrichi. Face à la complexité du protocole et aux moyens nécessaires importants pour isoler les EVs par centrifugation différentielle, de nombreuses méthodes alternatives ont été développées depuis une dizaine d'années telles que la chromatographie d'exclusion stérique, l'utilisation d'agents précipitants …, la présentation de ces différentes méthodes ayant été rapportée dans le chapitre précédent.

Afin de mener à bien l'étude des EVs dans le cadre de ce projet de thèse et de façon à suivre au mieux les recommandations établies par l'ISEV, une étude préliminaire des méthodes d'isolement et de caractérisation des EVs disponibles dans l'environnement de la thèse a été faite. En effet, seule une faible variabilité, à la fois physique et biochimique, d'un échantillon biologique à l'autre permet d'assurer la reproductibilité des expériences. En parallèle, une méthode simple à mettre en œuvre sera d'autant plus appréciée. Ainsi, la recherche d'une méthodologie permettant un bon équilibre « reproductibilité *versus* facilité de mise en œuvre » a été effectuée. Les laboratoires du CEA Leti et du SyMMES disposent de différents équipements permettant l'isolement d'EVs - comme une ultracentrifugeuse ou un système de chromatographie d'exclusion stérique - et la caractérisation physique - comme la DLS, le TRPS et le NTA, disponible à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Cependant, aucun protocole standardisé pour les EVs n'est à ce jour disponible dans ces laboratoires. Dans cette optique, l'isolement d'EVs a été envisagé par centrifugation différentielle et par chromatographie d'exclusion stérique, tandis que la caractérisation des profils de taille des EVs a été étudiée par NTA, DLS et TRPS.

En vue de l'utilisation d'aptamères pour cibler les EVs par des protéines membranaires spécifiques (CD63, CD81 et EpCAM), une étude approfondie des marqueurs protéiques exprimés en fonction de différentes lignées cellulaires a été aussi menée. Des méthodes de reconnaissance/capture basées sur l'utilisation d'anticorps ont été développées afin de démontrer la possibilité de la capture de vésicules extracellulaires par ciblage des protéines membranaires décorant sa surface.

Ce chapitre pose les bases de l'étude des EVs permettant de mener à bien le projet global visant à développer de nouvelles méthodes pour l'isolement spécifique des EVs, potentiels biomarqueurs cancéreux.

1. Choix d'une méthode d'isolement des vésicules extracellulaires

1.a. Culture cellulaire de lignées modèles en vue de l'isolement de vésicules extracellulaires

Les cellules issues de lignées cellulaires sécrètent abondamment des EVs dans le surnageant de culture et sont donc une source abondante d'EVs modèles. Le choix de ces lignées utilisées est une étape majeure pour l'étude des EVs correspondantes.

Dans un premier temps, la lignée cellulaire THP-1 (monocytes cancéreux humains) a été sélectionnée. Ce modèle cellulaire n'exprime pas de biomarqueur de prolifération cancéreuse selon la littérature, par conséquent, les EVs résultantes de ces cellules exprimeront certainement uniquement des biomarqueurs propres aux EVs telles que les tétraspanines. Mais il constitue une lignée modèle pour le projet de thèse. La culture cellulaire de ces monocytes non adhérents est réalisée dans le milieu RPMI 1640 enrichi en Glutamax® supplémenté avec 10% (v : v) de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% (v : v) d'antibiotiques (mélange de Pénicilline et Streptomycine à 10 000 U/mL et 10 mg/mL). La culture est classiquement réalisée en changeant le milieu toutes les 48 à 72 heures. Les cellules sont ensemencées à environ 300 000 cellules/mL et passées à 80% de confluence soit environ 800 000 cellules/mL. Le passage s'effectue par centrifugation des cellules à 300 g puis par resuspension dans le volume de milieu adéquat.

Dans un second temps et afin de se placer dans des conditions adéquates pour la détection d'EVs issues de cellules cancéreuses, la lignée cellulaire MCF-7 a été retenue. Les cellules MCF-7 sont des cellules tumorales du sein. La culture de ces cellules adhérentes est réalisée dans le milieu MEM (*Minimum Essential Medium*) enrichi en Glutamax® supplémenté avec 10% (v : v) de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% (v : v) d'antibiotiques (mélange de Pénicilline et Streptomycine à 10 000 U/mL et 10 mg/mL). De même que pour les cellules THP-1, un changement de milieu est réalisé toutes les 48 à 72 heures. Les cellules sont passées à environ 80% de confluence soit environ 80 000 cellules/mL. Typiquement, le milieu de culture est retiré de la flasque de culture et les cellules sont rincées avec du DPBS (*Dulbecoo's Phosphate Buffer Saline*). Quelques millilitres de trypsine (0,05% ; v : v) sont ajoutés et la flasque est placée durant environ 10 minutes à 37°C. Une fois les cellules détachées, l'action de la trypsine est bloquée par ajout d'une large quantité de milieu de culture supplémenté en sérum. Une étape de centrifugation à 300 g durant 5 minutes permet de précipiter les cellules qui sont ensuite remises en solution dans le volume de milieu de culture adéquat (environ 12 mL pour une flasque de 75 cm^2 et 24 mL pour une flasque de 175 cm^2).

Comme décrit au début des années 2000, les cellules MCF-7 expriment de façon importante la protéine EpCAM, liée à l'adhésion cellulaire des cellules épithéliales et marqueur de prolifération cellulaire cancéreuse[345].

Classiquement, la viabilité des cellules est vérifiée par comptage avec du bleu de Trypan pour s'assurer d'un taux de cellules viables d'au minimum 95%. Le nombre de cellules avant isolement de vésicules extracellulaires est aussi évalué afin de pouvoir déduire le taux de vésiculation des cellules (nombre d'EVs produites par cellule).

Il est important de noter que le FBS, comme tout fluide biologique, contient un grand nombre d'EVs. Afin d'isoler les EVs issues uniquement des cellules en culture, il est nécessaire de retirer au maximum les EVs provenant du FBS. Pour cela, du milieu supplémenté en FBS est ultracentrifugé durant 18 heures à

100 000 g afin de former un culot d'EVs du FBS et de récupérer du milieu supplementé en FBS sans EVs que l'on dénommera par la suite milieu supplémenté *exo-free*. 48 heures avant l'isolement, les cellules sont abondamment lavées avec du DPBS puis resuspendues dans ce milieu de culture *exo-free*.

1.b. Centrifugation différentielle

Comme décrit précédemment, le protocole de centrifugation différentielle repose sur la précipitation progressive des particules de taille décroissante d'un échantillon biologique complexe. Le protocole mis en place est basé sur le protocole publié par l'équipe de Clotilde Théry[46] en 2006. Cette méthode reste la plus communément adoptée dans la communauté scientifique des EVs.

Les cellules, les cellules mortes et les débris cellulaires sont retirés sucessivement avec des centrifugations à 300 g ; 2 000 g et 10 000 g durant 10 minutes à température ambiante dans une centrifugeuse à rotor oscillant (Eppendorf, 5810 R). Finalement, le milieu de culture est ultracentifugé durant 2 heures à 100 000 g à 4°C dans une centrifugeuse Beckmann Coulter Optima LK-90 avec le rotor à angle fixe Ti70. Les culots contenant les vésicules extracellulaires sont rassemblés afin de concentrer l'échantillon d'EVs durant une ultime étape d'ultracentrifugation à 100 000 g. Classiquement, huit flasques T175 cm2 (soit environ 200 mL de milieu) sont utilisées et permettent d'obtenir un échantillon d'environ 500 µL d'EVs concentrées à 10^{10} EVs/mL.

1.c. Chromatographie d'exclusion stérique

Cependant, l'ultracentrifugation a l'inconvénient de ne pas être spécifique des EVs, et des protéines/agrégats protéiques peuvent également être présents dans le culot. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une alternative qui apparaît complémentaire à l'ultracentrifugation. Un protocole adapté des recommandations du fournisseur (**Izon**, UK) a été établi pour remplacer l'ultracentrifugation par une colonne d'exclusion stérique isolant les particules entre 50 et 300 nm. Cette méthode ne permet pas d'isoler autant d'EVs que l'UC car le volume de surnageant de culture cellulaire déposé sur la colonne est de l'ordre de quelques millilitre(s) alors que plusieurs dizaines de millilitres sont possibles en UC. Ainsi théoriquement, l'échantillon collecté contient un nombre plus faible d'EVs que par UC. Les protéines et autres particules contaminantes seraient également moins présentes dans l'échantillon. Face à ce constat, l'association de l'ultracentrifugation et de la purification par colonne d'exclusion stérique a aussi été testée. Toutefois, la SEC ne permet pas de concentrer l'échantillon et l'association des techniques d'UC et de SEC est trop longue dans la durée pour l'utilisation en routine de cette méthode (un jour et demi *versus* une demi-journée pour l'UC).

1.d. Comparaison du profil d'EVs issues de cellules THP-1 obtenues par différentes méthodes d'isolement

Les profils de taille et de concentration d'EVs provenant de cellules THP-1 ont été analysés par *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Ces analyses ont été faites en veillant à fixer les paramètres de l'instrument à un niveau de caméra de 15 et un seuil de détection des particules à 7. Ces réglages correspondent à l'intensité du laser et au seuil de détection des particules lors de l'analyse de l'échantillon par le logiciel. Les EVs ont été isolées par UC, SEC et par association UC et SEC. Le protocole détaillé d'analyse des EVs par NTA est disponible en annexe. Les résultats sont présentés sur la *Figure 2.1*.

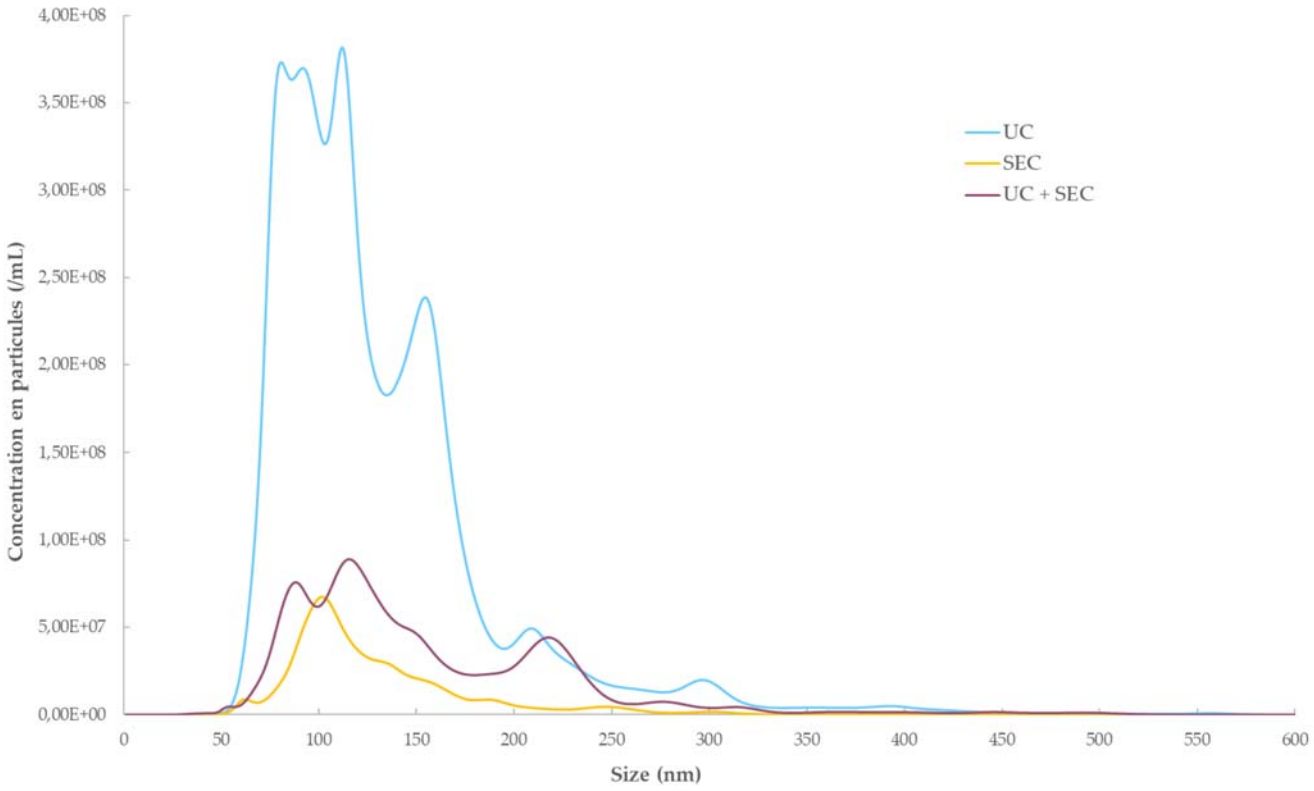


Figure 2.1 : Etude du profil de taille et concentration d'EVs isolées à partir de cellules THP-1 obtenu en fonction de la méthode d'isolement.

EVs de THP-1	**UC**	**SEC**	**UC + SEC**
Diamètre modal (nm)	94	103	125

Tableau 2.1 : Valeurs des diamètres modaux obtenus par analyse NTA des EVs issues de cellules THP-1 en fonction de la méthode d'isolement.

Les profils de taille des EVs issues de cellules THP-1 isolées respectivement par UC, SEC ou association UC et SEC sont relativement similaires avec une population majoritaire d'EVs entre environ 80 et 150 nm (*Figure 2.1*). Dans le profil de taille des EVs isolées par ultracentrifugation, deux sous-populations apparaissent clairement entre environ 80 et 150 nm : une première importante autour de 80-120 nm et une seconde aux environs de 150 nm. *A contrario*, dans l'isolement par SEC, une unique population majoritaire à environ 100 nm apparait. Ceci peut être expliqué par le fait que la colonne va permettre de cibler une taille précise de vésicules extracellulaires. Ainsi, plus les particules sont de taille importante moins elles seront retenues longtemps dans la colonne. Un biais peut alors apparaître quant au profil de taille de la totalité de la population d'EVs issues de cellules THP-1 obtenue par isolement SEC. De plus, on peut noter une diminution importante de la concentration d'EVs dans l'échantillon lors du passage sur une colonne d'exclusion stérique qui dilue intrinsèquement l'échantillon : pic majoritaire de l'UC à $3{,}5 \times 10^8$ EVs/mL *versus* pic majoritaire de la SEC à 6×10^7 EVs/mL soit une diminution de la concentration par un facteur cinq. Pour rappel, le diamètre modal est le diamètre moyen obtenu pour la population modale de l'échantillon, c'est-à-dire, la population majoritaire. Une vision plus globale de ces deux échantillons peut être envisagée en comparant les diamètres modaux des EVs isolées par UC et SEC obtenus par NTA : ils

sont respectivement de 94 et 103 nm (*Tableau 2.1*). La différence de moins de 10 nm ne permet pas à ce niveau de conclure à une différence significative de taille moyenne de l'échantillon d'EVs issues de cellules THP-1 en fonction de la méthode d'isolement. Cependant, la méthode d'isolement semble avoir un réel impact sur les sous-populations d'EVs en termes de distribution et de rendement.

En combinant l'UC à la purification par SEC, le profil en taille des EVs issues de cellules THP-1 ne varie pas du profil correspondant aux EVs THP-1 isolées par UC en termes de sous-populations. En effet, une sous-population majoritaire apparaît autour d'environ 80-120 nm, avec un épaulement traduisant une sous-population à 150 nm et une dernière sous-population à environ 220 nm : cette distribution démontre les similitudes des deux échantillons en termes de taille. En ce qui concerne la concentration, après passage sur la colonne d'exclusion stérique, l'échantillon est à diluer d'un facteur quatre.

Bien que les colonnes d'exclusion stériques soient des outils d'isolement d'EVs à bas coût et facilement maitrisables par l'utilisateur, cette méthode ne permet pas d'accéder à un échantillon concentré en EVs. La concentration est un critère important dans un échantillon d'EVs. En effet, les caractérisations physiques telles que le NTA sont à réaliser à des concentrations relativement élevées de particules (10^9 à 10^6 particules/mL). De plus, cette méthode n'est pas avantageuse en termes de gain de temps. Ainsi, dans un souci d'acquérir un échantillon riche en EVs, l'UC de milieu de culture cellulaire pour l'isolement d'EVs apparaît comme la méthode la plus efficace et sera utilisée en standard comme méthode de référence pour l'isolement des EVs.

2. Caractérisations physiques

2.a. Évaluation des instruments de caractérisation d'objets de taille nanométrique

La caractérisation en taille des échantillons de vésicules extracellulaires s'apparente à la caractérisation de nanoparticules polydisperses. En effet, les vésicules extracellulaires sont constitutivement hétérogènes en matière de taille allant de 50 à 300 nm. L'étude des différents instruments de caractérisation de taille disponibles est effectuée à partir d'un échantillon d'EVs issues de cellules THP-1 isolées par le protocole standard d'UC.

Une des méthodes les plus classiques dans le monde des nanoparticules est la DLS (*Dynamic Light Scattering*), basée sur la diffusion de la lumière de particules. Bien que performante, rapide et simple d'utilisation pour l'analyse en taille d'un grand nombre de types de nanoparticules[346], la DLS manque de résolution en présence d'un échantillon nanométrique polydisperse. En effet, en DLS, la diffusion des particules est d'autant plus grande que les particules sont de taille importante, masquant ainsi les particules les plus petites, mêmes si elles sont présentes en abondance.

Figure 2.2 : Profil de distribution en taille obtenu par DLS à partir d'un échantillon d'EVs issues de cellules THP-1 isolées par ultracentrifugation (mesure en intensité).

Comme le montre la *Figure 2.2*, les particules de plus grosse taille apparaissent comme représentant une partie considérable de l'échantillon de DLS avec trois pics majoritaires à 10, 100 et 600 nm, alors que la population principale d'EVs apparaissait centrée sur 80-150 nm au NTA (*Figure 2.1*). Décrite dans la littérature comme peu représentative du profil de distribution en taille des populations d'EVs, par comparaison avec des méthodes physiques de caractérisation comme la microscopie électronique en transmission[192], la DLS semble peu adaptée à la problématique de caractérisation en taille des EVs. De plus, cette méthode ne permet pas d'obtenir la concentration en particules de l'échantillon.

Une méthode techniquement proche, basée sur la diffusion de la lumière, mais dédiée aux échantillons polydisperses, le NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis)*, apparaît également comme une solution intéressante[192]. Cette technique permet une analyse complète d'échantillon de particules nanométriques de 50 à 800 nm. En une analyse, le profil en taille et en concentration de l'échantillon d'EVs est obtenu. Étant relativement facile d'utilisation, cet instrument permet d'accéder au profil de distribution en taille des EVs après une dilution importante de l'échantillon propre (de 100 à 10 000 fois soit à des concentrations d'EVs de 10^8 à 10^6 EVs/mL). Sur la *Figure 2.3*, on observe les sous-populations majoritaires entre 100 et 150 nm, une sous-population secondaire aux environs de 180-200 nm puis d'autres populations minoritaires de microvésicules autour de 280-400 nm. C'est un profil représentatif d'une population d'EVs issues de cellules THP-1 isolées par UC.

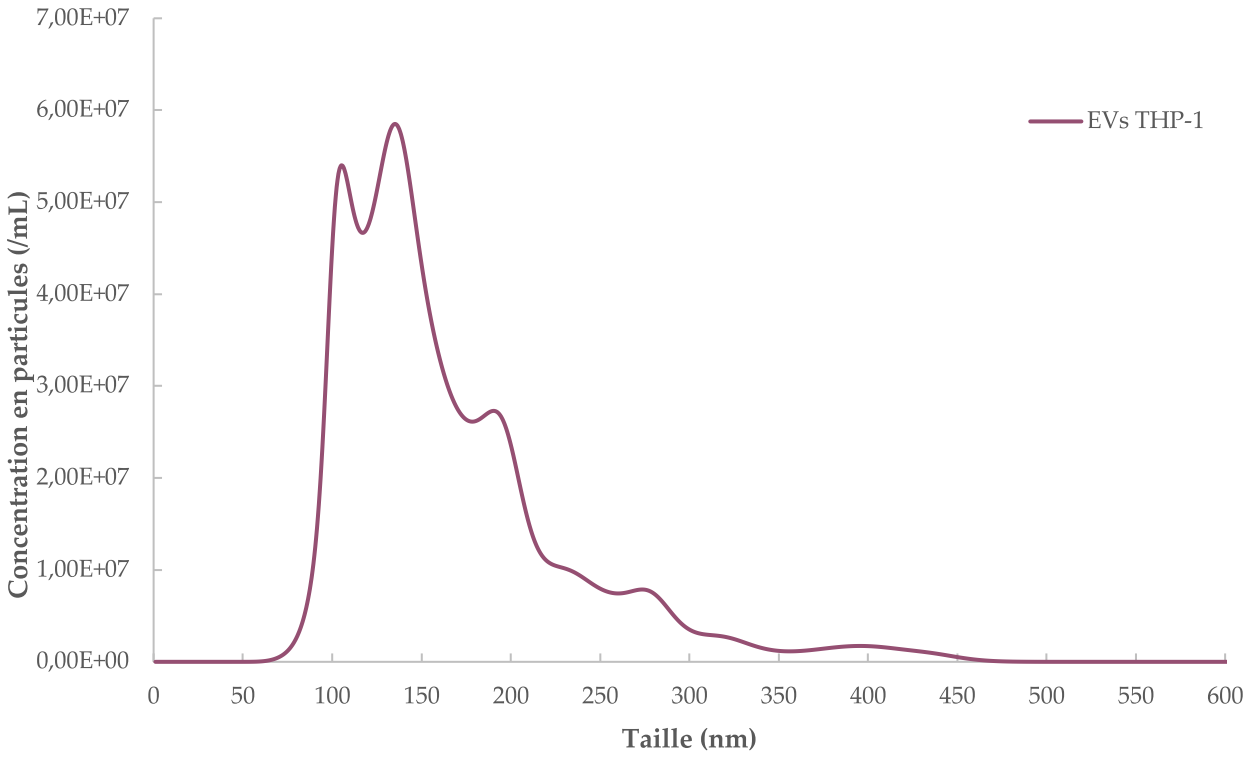


Figure 2.3 : Profil de distribution en taille des EVs issues de THP-1 isolées par ultracentrifugation obtenu par NTA.

Finalement, une dernière technique de caractérisation sera explorée : le TRPS (*Tunable Resistive Pulse Sensing*) sur l'équipement **IZON** dénommé qNano. Basée sur la chute de courant entre deux électrodes par le passage de particules à l'intérieur d'un pore, cette méthode est adaptable à différentes tailles d'échantillons en fonction de la taille du pore choisi et placé dans l'instrument. **IZON** propose des pores mesurant de 100 à 1 000 nm par exemple. Afin d'analyser l'échantillon de vésicules extracellulaires issues de cellules THP-1, un nanopore de diamètre 200 nm est utilisé dans notre cas. Une étape de calibration du nanopore est nécessaire et réalisée avec des nanoparticules calibrées à 200 nm elles aussi. Une dilution au 1 : 100 de l'échantillon issu de l'UC est réalisée dans du PBS. Un avantage majeur de la mesure est la faible quantité d'échantillon nécessaire pour effectuer l'analyse. En effet, une dizaine de microlitres suffit à générer le profil de distribution en taille des EVs issues de cellules THP-1. Le profil de distribution en taille des EVs issues de cellules THP-1 est montré sur la *Figure 2.4*.

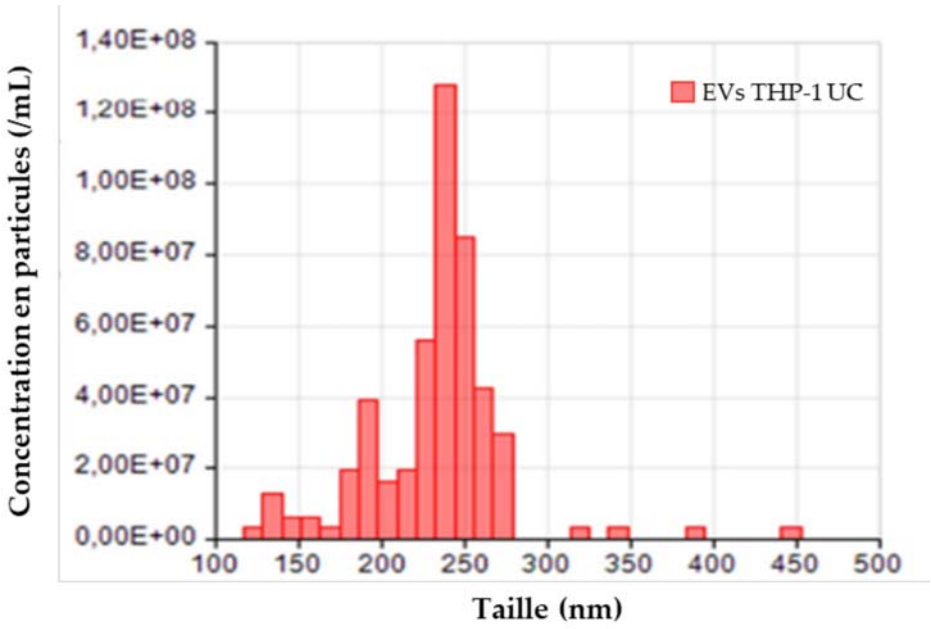


Figure 2.4 : Profil de distribution en taille d'EVs issues de cellules THP-1 isolées par ultracentrifugation et analysées par TRPS (qNano ; nanopore 200 nm).

Comme montré sur la figure ci-dessus, en étudiant l'échantillon d'EVs par TRPS avec un nanopore de 200 nm, la population analysée est centrée autour d'environ 230 nm. La population inférieure à 200 nm semble sous-estimée au vu du profil d'analyse obtenu par le nanopre de 100 nm et du profil NTA. L'autre analyse sur un nanopore de 100 nm est présentée sur la *Figure 2.5*.

Figure 2.5 : Profil de distribution en taille d'EVs issues de cellules THP-1 isolées par ultracentrifugation et analysées par TRPS (qNano ; nanopore 100 nm).

En utilisant le nanopore de 100 nm, la population d'EVs majoritaire apparaît centrée autour d'environ 160 nm. Tandis que la population à 230 nm visible sur la *Figure 2.4* est cette fois ci sous-estimée. Ces résultats n'ont pas été l'objet d'expériences approfondies, cependant, cela montre la nécessité d'analyser l'échantillon à travers plusieurs pores de tailles différentes. Bien que le TRPS permet l'accès à une mesure précise d'une sous-population, cette mesure reste relative à la taille du nanopore et elle ne permet pas

d'avoir une vision d'ensemble de l'échantillon d'EVs. Enfin, d'un point de vue utilisateur, cet instrument est très fastidieux d'utilisation et nécessite de passer un temps considérable pour analyser un échantillon (une demi-journée par échantillon).

En conclusion, d'après les différents résultats présentés précédemment, la méthode de choix retenue pour la caractérisation du profil en taille et concentration des EVs est le NTA en routine. La caractérisation physique par NTA pourra être complétée avec de la cryo-microscopie électronique en transmission quand cela est nécessaire.

2.b. Distribution en taille et en concentration : le système NTA

Le système de caractérisation physique du profil de taille et de concentration choisi précédemment est le NTA. Dans ce cadre, une étude plus approfondie de l'instrument et de la caractérisation des vésicules extracellulaires par celui-ci est envisagée.

2.b.i. Calibration du NTA à l'aide de nanoparticules de silice

Pour rappel, le système NTA est un instrument permettant l'analyse de particules nanométriques par collecte de la lumière diffusée par ces dernières. La lumière diffusée par les particules exposées à un laser de 488 nm permet un suivi du mouvement Brownien des particules. L'équation de Stockes-Einstein permet, elle, de mesurer le diamètre hydrodynamique de chaque particule permettant *in fine* de déterminer le profil de taille de l'échantillon complet. Différents paramètres doivent tout de même être adaptés en fonction de la nature de l'échantillon à analyser et de la diffusivité des particules. Ainsi, le niveau de sensibilité de la caméra ne sera pas le même pour des nanoparticules d'or ou des vésicules extracellulaires. Gardiner *et al.* rapportent que les indices de réfraction des vésicules extracellulaires s'approchent de nanoparticules de silice, avec des indices de réfraction à 1,40 et 1,46 respectivement (les billes de polystyrène ont un indice de réfraction de 1,59)[347]. Afin de s'assurer que les conclusions tirées à partir de cet instrument sont correctes, une étude de calibration du NTA a été réalisée à partir de nanoparticules de taille connue.

Pour cela, une large gamme de nanoparticules de silice de taille de 35 à 550 nm a été synthétisée selon le *Stöber process*[348]. Cette publication de Greasley et ses co-auteurs relatent le processus de synthèse qui consiste à former des particules de silice monodisperses en conditions basiques à partir de tetraéthyl orthosilicate (TEOS) dans une solution aqueuse contenant de l'alcool et de l'hydroxyde d'ammonium. Six synthèses de nanoparticules de silice ont ainsi été effectuées en variant la quantité d'hydroxyde d'ammonium afin d'obtenir une gamme de taille de 35 à 550 nm (*Tableau 2.2*), les concentrations d'eau et de TEOS sont respectivement de 6 M et 0,28 M ; tandis que le volume d'éthanol à ajouter est huit fois supérieur à celui correspondant à l'eau.

Concentration Hydroxyde d'ammonium	Taille Nanoparticules de Silice (TEM)
0,05 M	35 nm
0,10 M	75 nm
0,15 M	170 nm
0,30 M	420 nm
0,60 M	460 nm
1,20 M	520 nm

Tableau 2.2 : Variation de concentration en hydroxyde d'ammonium pour la synthèse d'une gamme de taille de nanoparticules de silice, la taille des nanoparticules est analysée en TEM.

Une fois ces synthèses réalisées, les résultats de caractérisation en taille obtenus par NTA sont comparés aux analyses DLS (*Figure 2.6*) et à la microscopie électronique à transmission (TEM), qui est la méthode de référence dans cette étude (*Figure 2.7*).

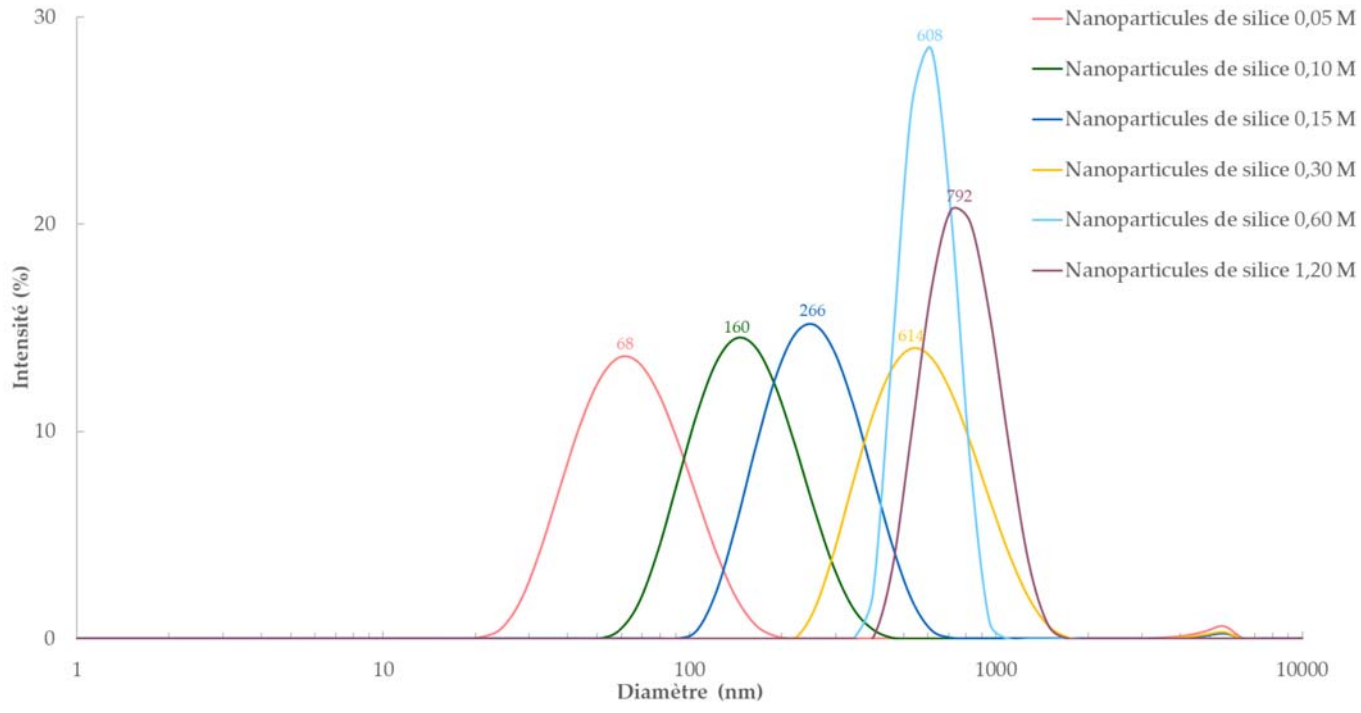


Figure 2.6 : Distribution en taille de la gamme de nanoparticules de silice obtenue par DLS.

Figure 2.7 : Images TEM et histogrammes de profil de distribution en taille obtenu par mesure des images TEM correspondant de la gamme de nanoparticules de silice, a) NPs de silice 0,05 M ; b) NPs de silice 0,10 M ; c) NPs de silice 0,15 M ; d) NPs de silice 0,30 M ; e) NPs de silice 0,60 M ; f) NPs de silice 1,2 M. Une centaine de nanoparticules ont été analysées pour établier les profils de taille.

Les résultats obtenus en DLS (*Figure 2.6*) montrent qu'*a priori,* les échantillons sont relativement monodisperses et les tailles des échantillons sont croissantes avec la concentration d'hydroxyde d'ammonium. Les échantillons sont ensuite analysés en microscopie électronique à transmission (TEM Tecnai gf20, grilles 200 mesh copper/carbon). De nombreuses images ont été collectées afin d'obtenir une bonne représentation de chaque échantillon (*a minima* une centaine de particules ont été mesurées). Ainsi, la mesure du diamètre de chaque particule imagée a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ et un histogramme de la fréquence du diamètre des nanoparticules a pu être retracé. En comparant les diamètres en DLS à ceux mesurés en TEM, une sur-estimation significative du diamètre est observée en DLS (*Tableau 2.3*). Par exemple, le lot de nanoparticules de silice 0,3 M est mesuré à 614 nm en DLS tandis que le diamètre moyen mesuré par intensité en TEM est 420 nm.

L'analyse de ces lots par NTA est finalement réalisée afin de calibrer l'instrument et de comparer les mesures à celles obtenues par microscopie électronique. Ainsi, les échantillons de nanoparticules, n'apparaissent pas complétement monodisperses (*Figure 2.8*). Cependant, les diamètres moyens mesurés sont très proches de ceux mesurés en TEM, bien plus que ceux obtenus par DLS (*Tableau 2.2*).

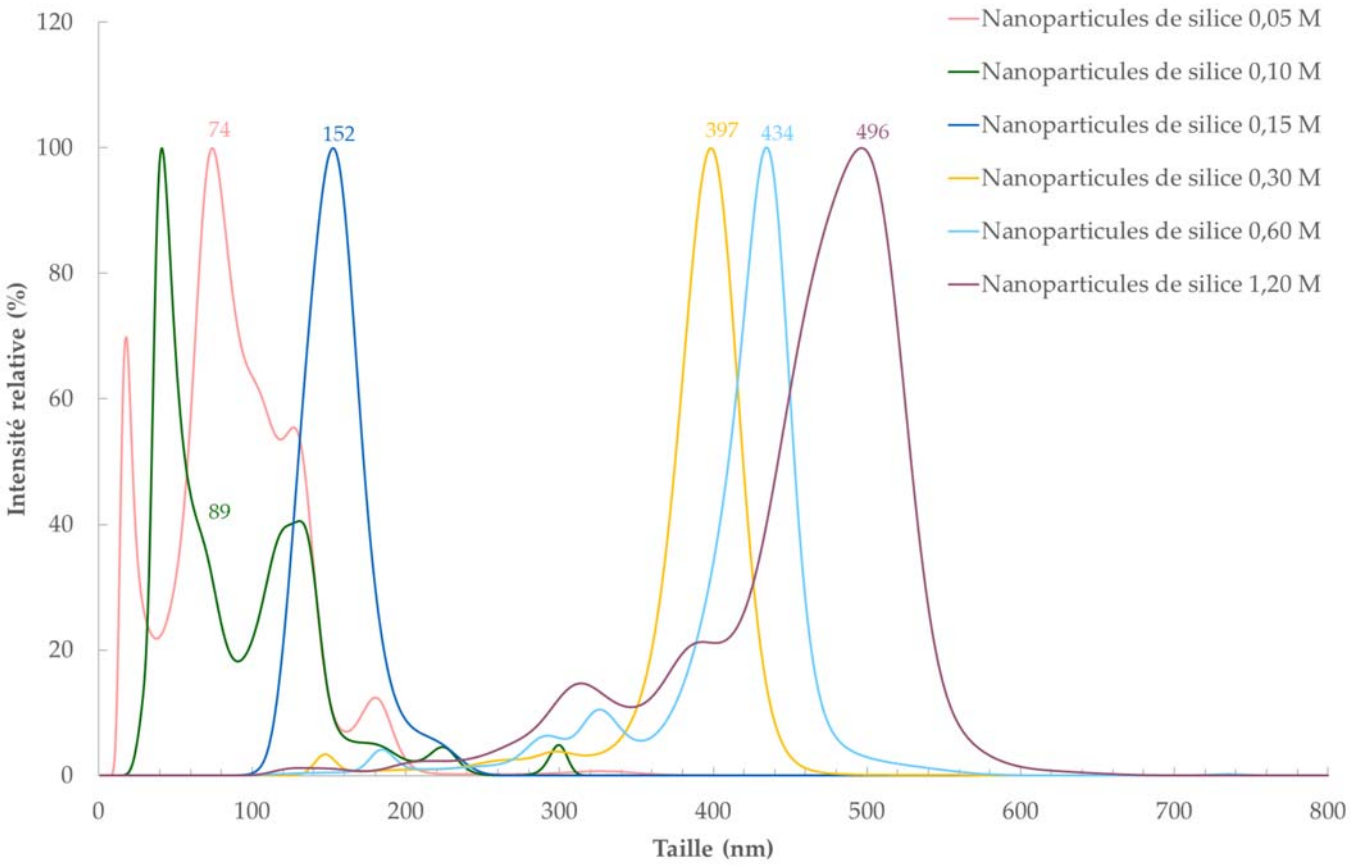


Figure 2.8 : Profil de distribution en taille obtenu par NTA pour la gamme de nanoparticules de silice.

		Nanoparticules de silice					
		0,05 M	0,1 M	0,15 M	0,3 M	0,6 M	1,2 M
Diamètre	DLS	68	160	266	614	608	792
	TEM	35	75	170	420	460	520
	NTA	74	89	152	397	434	496

Tableau 2.2 : Tableau récapitulatif des diamètres obtenus en nm de la gamme de nanoparticules de silice mesurées en DLS, TEM et NTA.

Pour conclure, la mesure en taille des nanoparticules de silice en NTA est relativement proche de la mesure de référence par TEM. Bien que les nanoparticules de silice soient un modèle rigide à la différence des EVs qui sont souples, ces nanoparticules de silice s'approchent au plus près de l'indice de réfraction correspondant aux EVs. Le NTA semble donc approprié et fiable pour l'analyse en taille des vésicules extracellulaires. Dans ce cadre, la mesure des échantillons d'EVs sera effectuée par NTA comme méthode de référence, en gardant en tête que les mesures de taille sont précises à 5% près.

2.b.ii. Analyse de suivi de nanoparticules de différents types de vésicules extracellulaires

Dans le cadre de ce projet, des vésicules extracellulaires de différents types cellulaires ont été isolées. Les lignées THP-1 et MCF-7 ont été des modèles pour l'isolement d'EVs. De plus, des EVs issues de plasma sanguin de patients sains ont été isolées. Les profils de taille de ces échantillons ont été analysés au NTA (*Figure 2.9*).

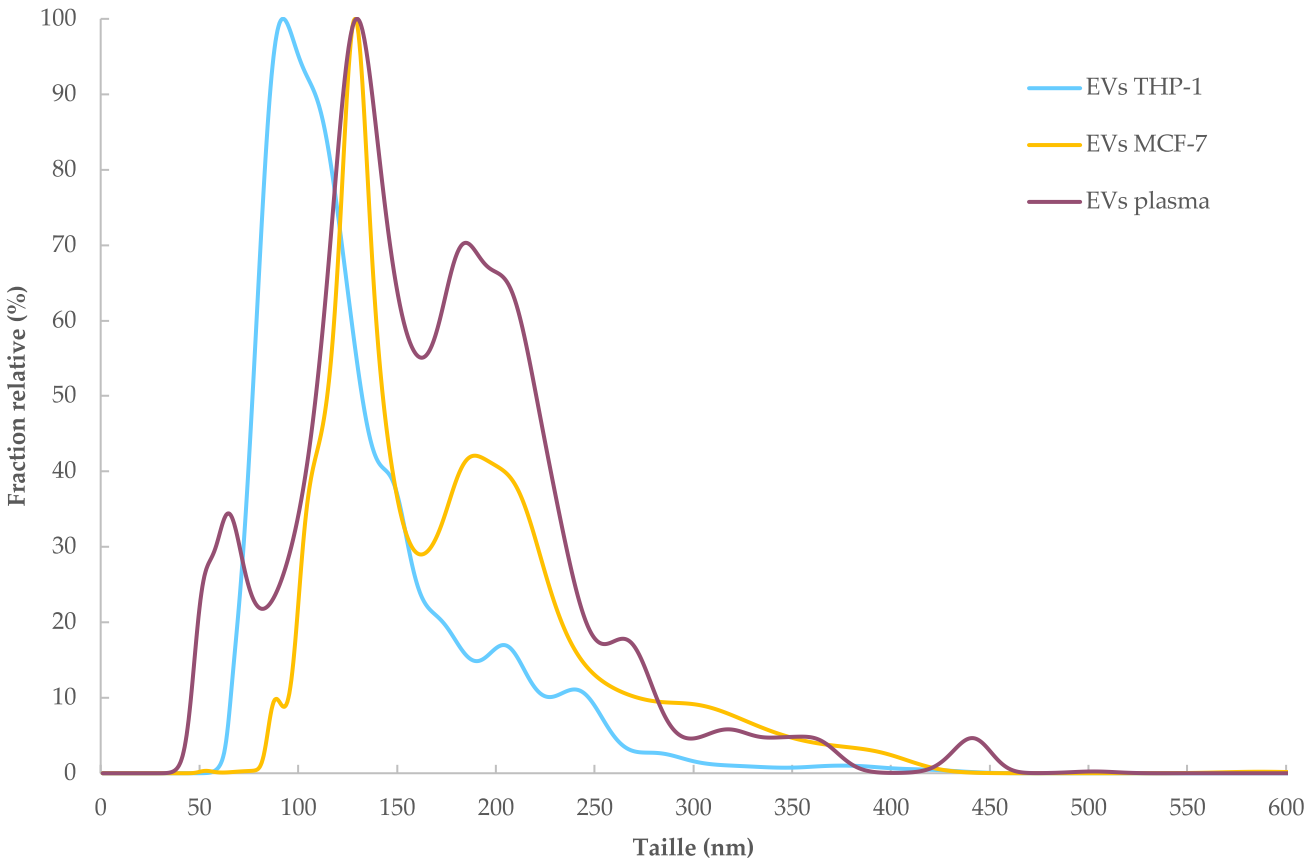


Figure 2.9 : Profils de distribution en taille de différents types de vésicules extracellulaires analysées par NTA.

Globalement, les profils de taille s'étirent entre environ 70 nm et 450 nm. Une sous-population majoritaire en taille est présente entre 80 et 120 nm, tandis qu'une seconde sous-population majoritaire est présente vers 180 nm (EVs issues de MCF-7 et de plasma). Il y a peu d'EVs de taille supérieure à 250 nm, laissant place à quelques sous-populations de microvésicules apparaissant vers 350 et 400 nm.

Quelques variations peuvent être observées en fonction des types de vésicules extracellulaires dans des sous-populations plus ou moins marquées. De plus, des variations biologiques d'un échantillon à l'autre peuvent aussi être observées.

L'analyse NTA permet aussi d'obtenir la concentration totale en EVs de l'échantillon. Lors du processus d'ultracentrifugation, la quantité de cellules contenue dans le milieu de culture est connue. Ainsi, un taux de vésiculation moyen peut être calculé en effectuant le ratio entre le nombre de vésicules obtenues et le nombre de cellules à l'origine. Les taux de vésiculation des cellules THP-1 et MCF-7 sont calculés par répétition de trois expériences d'isolement par ultracentrifugation. Les cellules THP-1 ont un taux de vésiculation moyen de $4{,}35 \times 10^3$ EVs/cellule tandis que les cellules MCF-7 ont un taux de vésiculation moyen de $3{,}48 \times 10^5$ EVs/cellule démontrant ainsi une sécrétion 100 fois plus importante de vésicules par la lignée MCF-7 (*Figure 2.10*) sur 48 heures.

Figure 2.10 : Taux de vésiculation des cellules THP-1 et MCF-7, calculés après isolement par ultracentrifugation à partir des données NTA.

2.b.iii. Évaluation de l'impact des méthodes de conservation/stockage d'échantillons de vésicules extracellulaires sur leur profil de taille

Afin de compléter l'étude sur les vésicules extracellulaires isolées par UC, une évaluation de l'impact des méthodes de conservation sur les échantillons de vésicules a été faite. Pour cela, deux types d'expériences ont été réalisées : tout d'abord, une étude de l'influence de la congélation (-20°C) *versus* la conservation à 4°C a été réalisée. Les EVs issues de cellules MCF-7 ont été isolées selon le processus classique d'UC. L'échantillon a été aliquoté et une partie a été stockée pendant 48 heures à 4°C tandis que l'autre a été stocké à -20°C durant 48 heures. L'analyse par NTA a ensuite été réalisée dans les mêmes conditions pour les deux échantillons. Entre les deux profils de distribution, une nette diminution de la concentration en EVs peut être observée pour l'échantillon stocké à -20°C, la concentration de la sous-population majoritaire étant divisée par trois. Le profil des différentes sous-populations reste peu affecté par la congélation de l'échantillon d'EVs (*Figure 2.11*).

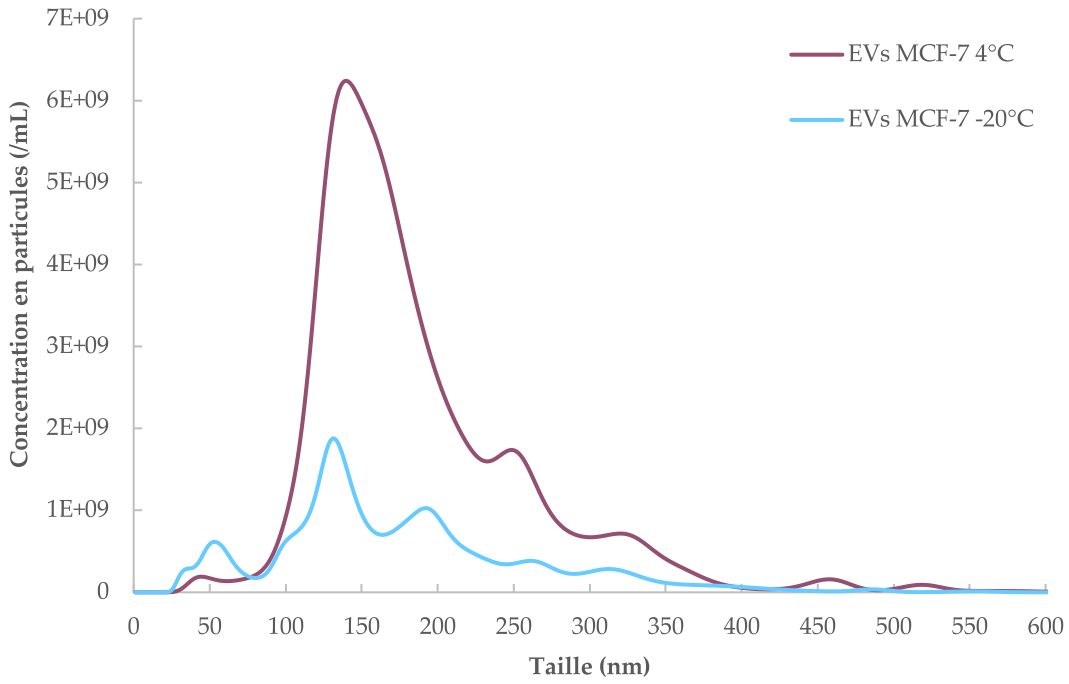


Figure 2.11 : Profils de distribution en taille et en concentration par NTA d'un échantillon d'EVs issues de cellules MCF-7 en fonction du type de conservation.

En parallèle, une étude du vieillissement des échantillons conservés à -20°C a été effectuée. Pour cela, différents lots d'EVs issues de cellules MCF-7 isolés par UC ont été aliquotés et conservés à -20°C entre 2 et 90 jours. Comme montré sur la *Figure 2.12* la concentration en vésicules extracellulaires semble décroître avec la durée de conservation. Cela reste une tendance et l'analyse doit tenir compte des incertitudes de la mesure de concentration par NTA. La concentration en particules dans l'échantillon J+20 est effectivement légèrement supérieure à celle de J+2. Globalement, les différentes sous-populations de taille ne sont pas fondamentalement modifiées et le profil général de distribution en taille reste globalement le même malgré le temps de congélation.

Cependant, il est à noter que le profil de distribution en taille d'un échantillon d'EVs ne traduit pas nécessairement l'intégrité des marqueurs présents à la surface des vésicules. En effet, une dégradation des protéines membranaires peut avoir lieu et fera l'objet d'une étude dans le **chapitre 3**.

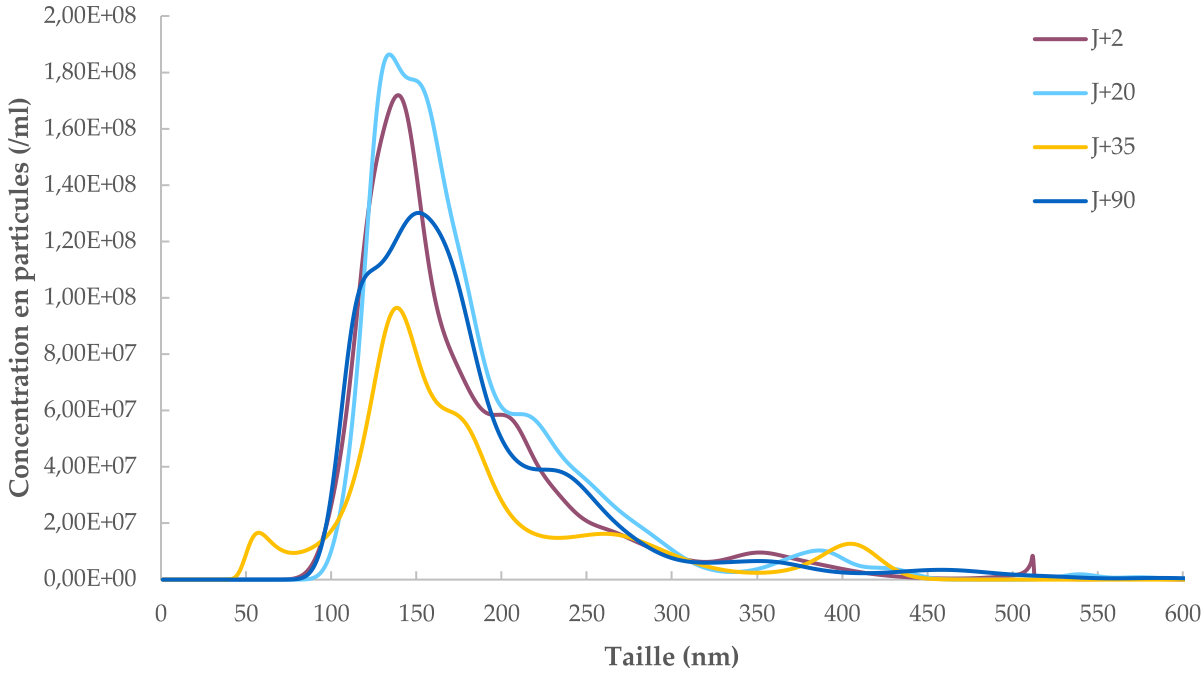


Figure 2.12 : Profils de distribution en taille et en concentration par NTA d'EVs issues de cellules MCF-7 en fonction du temps de conservation à -20°C.

Ainsi, en se basant sur le profil de distribution en taille d'EVs, la congélation de l'échantillon à -20°C n'a pas d'effet visible majeur sur les sous-populations d'EVs d'après l'analyse NTA.

2.c. Cryo-microscopie électronique

Enfin, la caractérisation de l'intégrité physique des vésicules extracellulaires peut être sondée par microscopie électronique en transmission (TEM). Classiquement utilisée pour la caractérisation de nanomatériaux, le TEM permet d'accéder à des images d'objets nanométriques. Cependant, les échantillons biologiques ne supportent pas les contraintes appliquées en microscopie électronique à transmission : à savoir, la fixation (pouvant modifier la morphologie et la taille des objets biologiques), l'observation sous vide et l'exposition au faisceau d'électrons. Ainsi, deux méthodes majeures de préparation d'échantillon peuvent être employées afin de visualiser des échantillons biologiques. Un premier type de préparation consiste en l'utilisation d'agent chimique pour la fixation préalable des EVs sur les lames minces d'observation. Cette méthode, plus facile à mettre en œuvre, engendre des déformations de membranes non négligeables. Une seconde méthode consiste à utiliser la cryogénie pour la préparation d'échantillon biologique, ce qui permet de figer les objets biologiques sur la grille de microscopie par trempage dans une solution d'éthane liquide. Une couche d'une centaine de nanomètres de glace vitreuse permet de conserver l'intégrité des particules biologiques pour l'observation en microscopie électronique (protection contre la dégradation par le faisceau d'électrons). Le CEA Leti disposant d'une plateforme de haute technologie pour l'analyse d'échantillons nanométriques, nous avons pu faire de la cryo-microscopie électronique.

Pour cela, un échantillon d'EVs issues de cellules MCF-7 a été isolé par UC et conservé à 4°C durant 24 heures. La préparation d'échantillon a été réalisée sur une grille de microscopie recouverte d'un film de carbone et la vitrification a été faite à l'aide de l'instrument Vitrobot (FEI Company). Le protocole détaillé est disponible en annexe de ce manuscrit. Les observations de microscopie électronique ont été réalisées sur un microscope électronique à transmission FEI Tecnai Osiris à 200 kV. Des images de vésicules sont montrées sur la *Figure 2.13*. L'image de gauche montre la polydispersion de l'échantillon d'EVs avec trois vésicules extracellulaires d'environ 80 ; 120 et 200 nm. Sur l'image centrale, une vésicule extracellulaire est éclatée tandis que sur l'image de droite, deux vésicules sont enchevêtrées. Ces deux phénomènes sont des effets indésirables des forces appliquées à l'échantillon lors de l'UC[349].

Figure 2.13 : Images d'EVs issues de cellules MCF-7 obtenues par cryo-TEM.

Bien que cette technique de caractérisation soit longue et coûteuse à mettre en place, elle permet d'avoir une estimation de l'intégrité physique des vésicules extracellulaires isolées par ultracentrifugation. L'échantillon est majoritairement représenté par l'image de gauche avec une polydispersion importante mais des éclatements et enchevêtrements d'EVs sont aussi minoritairement observés. Bien que seulement une trentaine de vésicules ait pu être mesurée, un profil de distribution en taille a été reconstitué. Comme montré sur la *Figure 2.14*, le profil de taille et fréquence des EVs issues de cellules MCF-7 observé en cryo-TEM est similaire à celui analysé par NTA. Ceci démontrant une nouvelle fois, la pertinence du NTA pour l'analyse d'un échantillon nanométrique polydisperse. Bien que pour réaliser une statistique globale il aurait été nécessaire d'analyser en cryo-TEM au minimum une centaine d'EVs pour obtenir une distribution en taille robuste. L'objectif de cette analyse cryo-TEM visait à vérifier les données produites par l'analyse NTA.

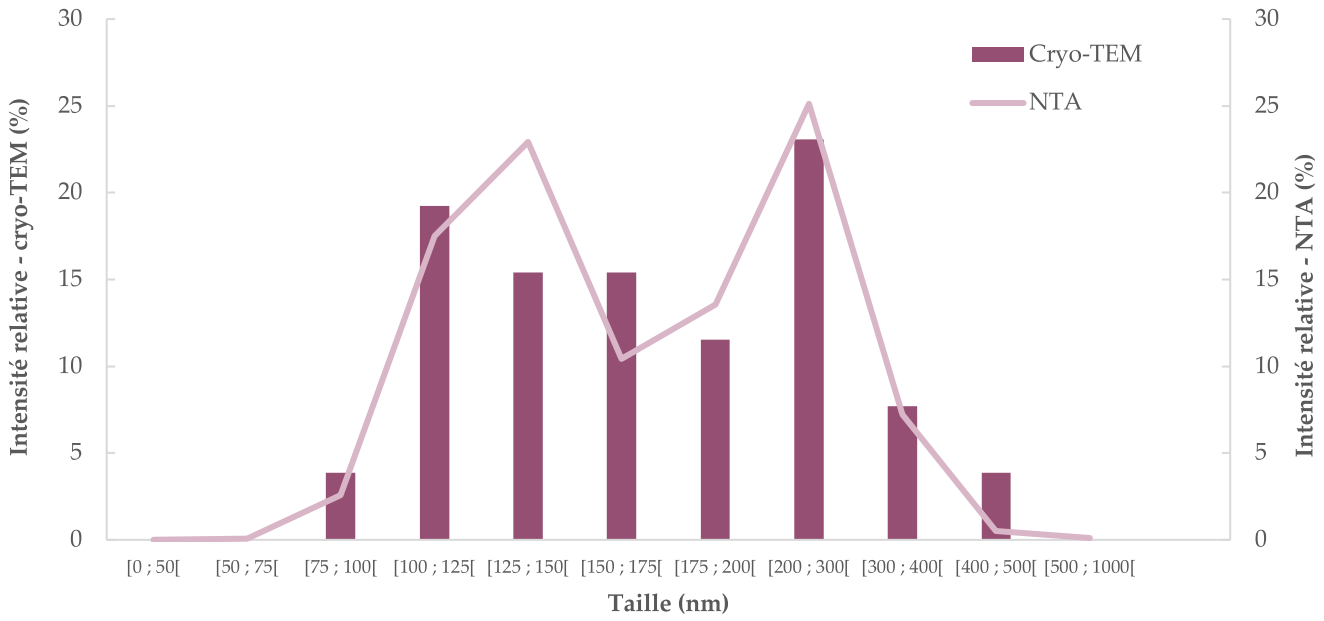


Figure 2.14 : Histogramme de la fréquence du diamètre des EVs issues de cellules MCF-7 observées en cryo-TEM couplé au profil de taille obtenu par NTA.

3. Caractérisations biochimiques

Une fois la caractérisation physique des échantillons d'EVs réalisée, la présence des protéines d'intérêt (CD63, CD81 et EpCAM) reste à démontrer. La méthodologie adoptée ici consiste à tout d'abord vérifier par *western blot* (WB) la présence des protéines ciblées dans l'ensemble de l'échantillon, puis, la présence des protéines à la surface d'EVs par ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

3.a. Caractérisation protéique de l'échantillon de vésicules extracellulaires par *western blot*

La technique de *western blot* (WB) est une méthode de biochimie permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques contenues dans un échantillon biologique à l'aide d'anticorps dirigés contre ces dernières. Le WB permet de visualiser des protéines d'intérêt parmi un mélange complexe, qu'elles soient intra ou extracellulaires

Comme précédent décrit[46], il est important de vérifier la présence de protéines caractéristiques des EVs à l'issue de leur isolement. Les protéines communes aux autres classes d'EVs sont ALIX, TSG101, l'Actine, Hsc70/HSP60 et des tétraspanines CD63, CD81 et CD9, la Calnexine étant un contrôle de la contamination par le réticulum endoplasmique. Dans un premier temps, les EVs de THP-1 sont lysées et analysées par WB pour les tétraspanines CD63 et CD81. Comme montré sur la *Figure 2.15*, ces EVs expriment relativement faiblement CD63 et fortement CD81. Malgré une quantité importante de protéines chargées dans le gel de polyacrylamide (environ 10 µg), il n'y a pas de signal visible pour les marqueurs CD9, ALIX et Hsc70, reflétant la pauvreté protéique des vésicules extracellulaires issues de THP-1. De plus, la protéine EpCAM n'est pas exprimée ; or c'est un marqueur d'intérêt dans le projet.

Figure 2.15 : Analyse protéique par WB d'EVs issues de cellules THP-1.

Suite à ces résultats mitigés sur la présence des protéines à cibler pour identifier les EVs issues de cellules THP-1, les protéines des EVs issues de cellules MCF-7 ont été analysées. La présence des protéines constitutives intravésiculaires ALIX, TSG101, HSP60, Actine ainsi que membranaires CD9, CD63 et CD81 a été détectée par WB pour les EVs issues des cellules MCF-7 ; une petite contamination acceptable a par ailleurs été révélée pour la Calnexine (*Figure 2.16*).

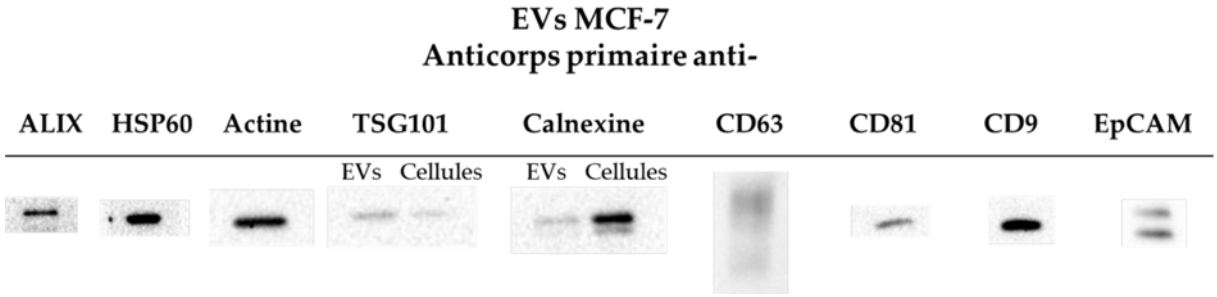


Figure 2.16 : Analyse protéique par WB d'EVs issues de cellules MCF-7.

La figure ci-dessus démontre la présence d'un grand nombre des protéines intraexosomales communes : ALIX, TSG101, HSP60, Actine. De plus, la Calnexine est très peu contaminante dans l'échantillon d'EVs mais fortement présente dans l'échantillon cellulaire correspondant. Les marqueurs membranaires vésiculaires, les tétraspanines, caractéristiques d'un mode de sécrétion par voie endosomale, sont bien présents. La présence de CD63 n'apparaît pas sous la forme d'une bande bien définie mais cela est assez commun (glycosylation) et a déjà été fréquemment observé[45,350]. Enfin, l'expression du marqueur EpCAM par les EVs issues de cellules MCF-7 apparaît sous plusieurs bandes aux environs de 35 kDa, ce qui est satisfaisant. La plus grande richesse en protéines des EVs issues de cellules MCF-7 peut aussi être appréciée par le fait que seulement 4 µg de lysat protéique vésiculaire ont été déposés pour obtenir les résultats de WB ci-dessus ; 1,5 µg d'extrait de cellules MCF-7 a été déposé en parallèle. Les contrôles positifs protéiques assurant la spécificité des bandes observées n'ont pas pu tous être réalisés. Tout de même, les extraits cellulaires correspondants ont été déposées dans les puits adjacents aux puits d'EVs lorsque cela a été possible (TSG101 et Calnexine). De plus, les poids moléculaires des protéines ciblées correspondent aux poids moléculaires théoriques/observés de ces protéines. Enfin, l'accès nécessairement commercial à ces protéines purifiées engendreraient un surcoût important et ne semble pas nécessaire pour démontrer la spécificité des résultats. Ces caractérisations biochimiques ont été réalisées en collaboration avec Pascal Colosetti (Laboratoire CarMeN, Lyon). Les anticorps utilisés ainsi que le protocole détaillé sont disponibles en annexe.

3.b. Caractérisation des protéines membranaires des vésicules extracellulaires : utilisation d'un kit commercial de test ELISA

Suite à l'analyse de certaines protéines vésiculaires, la détection des EVs en ciblant les biomarqueurs membranaires est nécessaire. Le test ELISA, comme présenté dans le **chapitre 1**, est une technique de biochimie permettant la détection d'un antigène, dans ce cas de protéines membranaires vésiculaires d'intérêt, par reconnaissance par un anticorps spécifique. Cette détection est suivie par une réaction catalysée par une enzyme (HRP) permettant la libération d'un composé coloré mesurable par spectrophotométrie. Pour rappel, il existe différents types de tests ELISA comme décrit au **chapitre 1** dont le test ELISA direct (par immobilisation de l'antigène en fond de puits) et l'ELISA *sandwich* (en ciblant deux marqueurs membranaires possiblement différents par un *sandwich* d'anticorps de capture et de détection).

Dans un premier temps, un test ELISA de type direct a été réalisé afin de tester la présence du marqueur CD63 à la surface des EVs issues de différents échantillons. Ce marqueur a été choisi comme marqueur modèle pour débuter les tests ELISA et démontrer la faisabilité de l'approche de ciblage d'EVs par leurs biomarqueurs membranaires. Tout d'abord, le kit commercial exo-ELISA de la société **System Biosciences** (**SBI**) a été utilisé. Ce kit est un ELISA de type direct où les EVs sont immobilisées au fond des puits de la plaque 96 puits, la détection a été réalisée en ciblant les protéines CD63 par les anticorps primaires correspondants puis par les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP (*Horseradish peroxydase*). Le montage moléculaire est décrit sur la *Figure 2.17*. Enfin, la révélation a été réalisée par ajout du substrat chromogénique de l'enzyme HRP : le TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine). Le protocole détaillé est disponible sur la fiche fournie par la société **SBI**. La couleur bleue caractéristique de la réaction est stoppée par ajout d'une solution d'acide sulfurique et la lecture de l'absorbance de chaque puits est réalisée à l'aide d'un lecteur multi-plaques (M1000, TECAN) à 450 nm.

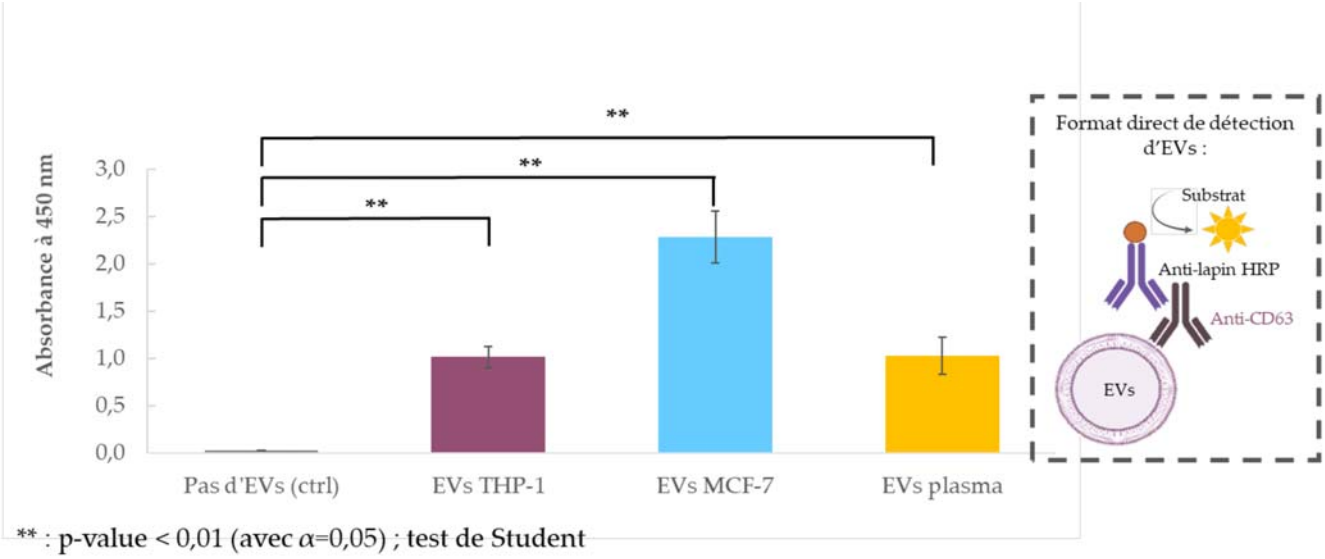


*Figure 2.17 : Détection d'EVs de différents types par ciblage de la protéine CD63 par le kit commercial SBI. Histogramme de l'absorbance à 450 nm pour différents types d'EVs. Chaque condition représente un total de neuf valeurs : trois puits par plaque et un total de trois plaques. ** = erreur p < 0,01 avec α = 0,05. Il a été estimé que ces valeurs suivaient une loi normale de façon à réaliser le test de Student.*

Pour chaque échantillon, l'efficacité de la détection des EVs a été confirmée en évaluant la présence de CD63 à leur surface (*Figure 2.17*). L'absorbance à 450 nm est directement corrélée à la transformation du

TMB par la HRP. Par conséquent, l'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines CD63 qui a lié la cascade d'anticorps anti-CD63 + IgG anti-lapin-HRP. Le contrôle négatif est réalisé en l'absence d'EVs adsorbées en fond de puits ; la BSA (*Bovine Serum Albumin*) présente dans le tampon de blocage tapisse ainsi le puits afin d'éviter toute liaison non spécifique des anticorps. Comparés au contrôle négatif, les trois échantillons d'EVs ont conduit à un signal positif. La variation non négligeable des valeurs d'absorbance entre les échantillons (entre 1,0 et 2,5) montre la grande variabilité du niveau d'expression de CD63 en fonction du type cellulaire à l'origine des EVs. Ces expériences ont été réalisées en triplicat et ont été reproduites indépendamment trois fois afin d'en évaluer la répétabilité.

Dans le domaine de la biologie et notamment des tests diagnostiques, la significativité des résultats est fréquemment vérifiée. Affirmer qu'un résultat est significativement différent de la valeur correspondante du contrôle négatif peut être réalisé par des tests statistiques. Dans le cas des tests ELISA, l'utilisation de test de Student visant à déterminer la significativité de la différence des moyennes μ (expériences *versus* contrôle négatif) est faite. Préalablement, il convient de vérifier que les valeurs suivent une loi normale. Deux hypothèses H_0 et H_1 sont posées : $H_0 : \mu_0 - \mu_1 = 0$ (les moyennes sont égales) et $H_1 : \mu_0 - \mu_1 \neq 0$ (les moyennes sont différentes). Le risque d'erreur α est fixé, très fréquemment à 5 %. La valeur statistique z est calculée ainsi que la probabilité correspondant à cette valeur z. La valeur de probabilité obtenue (*p-value*) correspond à la probabilité que la valeur z soit contenue dans un intervalle de valeur défini. Ainsi, si la *p-value* est inférieure à z alors on rejette l'hypothèse H_0 et on accepte l'hypothèse H_1. Les moyennes sont significativement différentes. Si la *p-value* est supérieure à z alors on accepte l'hypothèse H_0. Les moyennes sont égales. Le principe du test statistique de Student est schématisé sur la *Figure 2.18*.

Figure 2.18 : Principe de test statistique de Student[351].

Ainsi, suite aux résultats obtenus et vérification de l'égalité des variances, des tests statistiques de différence des moyennes ou de Student, après vérifications de l'égalité des variances, ont été réalisés en fixant le risque α à 0,05. Dans les trois cas, la moyenne d'absorbance obtenue est significativement différente du contrôle négatif avec une *p-value* inférieure à 0,01. Il est à noter que ces résultats ont été obtenus en effectuant une dilution au dizième des EVs issues de lignées cellulaires et au centième des EVs issues de plasma. Cela démontre la concentration importante des EVs isolées à partir de plasma des patients sains (bien que non visibles directement sur la *Figure 2.17)*. En effet, les fluides biologiques comme

le plasma rassemblent beaucoup d'EVs d'origines diverses, qui sont donc retrouvées en plus forte concentration par rapport aux EVs isolées de culture de lignées cellulaires. La réponse importante des EVs issues de cellules MCF-7 à ce test ELISA confirme les résultats préliminaires obtenus par WB quant à la forte expression de CD63. Pour cette raison et également pour l'expression du marqueur EpCAM par ce type de cellules cancéreuses, les expériences suivantes seront restreintes aux EVs issues de cellules MCF-7.

3.c. Développement d'un test immunologique ELISA direct de détection des protéines membranaires des vésicules extracellulaires

En vue du développement d'un test ELISA *sandwich* ciblant différentes protéines et indépendant d'un système commercial, une étape nécessaire est le développement d'un test ELISA direct adéquat. En effet, aujourd'hui il n'existe que la société **SBI** qui commercialise des kits ELISA pour EVs[352]. Seulement, deux kits commerciaux sont disponibles pour cibler les protéines CD81 ou CD63 à ce jour. Pour cela, deux types d'anticorps ciblant CD63 et CD81, provenant de deux fournisseurs différents, ainsi qu'un anticorps contre EpCAM ont été testés. Les références des anticorps utilisés ainsi que les protocoles détaillés sont disponibles en annexe. La *Figure 2.19* présente brièvement les différentes étapes du test ELISA direct-EVs immobilisées.

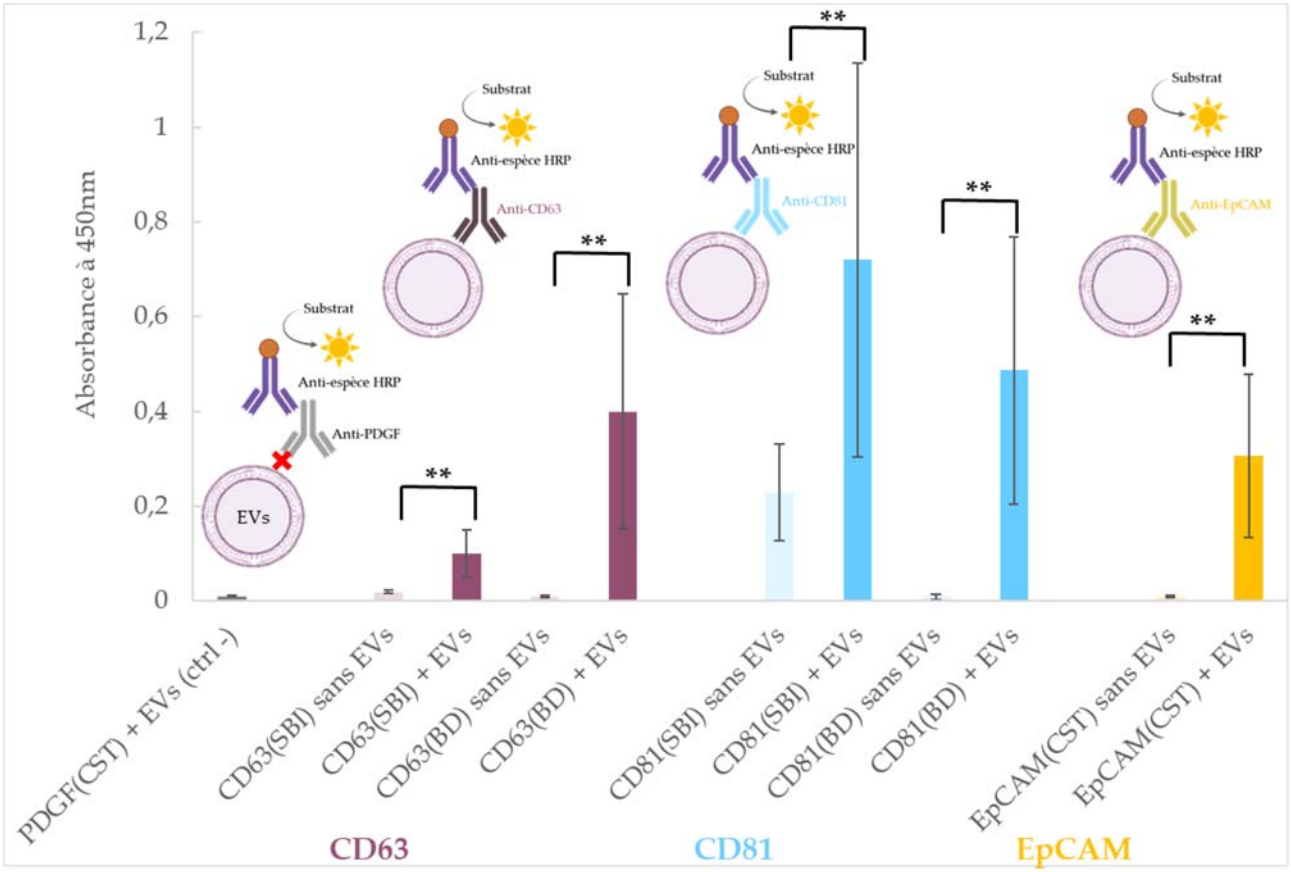
Figure 2.19 : Les différentes étapes du test ELISA direct-EVs immobilisées.

Afin de mettre au point ce protocole propre au projet, différents paramètres ont dû être évalués comme la composition du tampon de blocage. Différents tests ont été faits afin de déterminer la concentration de BSA appropriée pour le tampon de blocage. En effet, une étape de blocage avec une solution de BSA à 5% (m : v) dans le PBS a tout d'abord été envisagée avec comme tampon de rinçage une solution de PBS (l'utilisation de détergent en présence d'EVs intègres est à proscrire afin de préserver la membrane lipidique). Une grande variabilité des signaux a été observée et a permis de conclure à la mauvaise qualité du blocage par la BSA visant à réduire le signal non-spécifique. Le tampon de blocage a ensuite été modifié avec une concentration en BSA de 1% ; cette même concentration a été ajoutée dans le tampon de rinçage. La variabilité des signaux a fortement diminué permettant l'obtention d'un protocole robuste. La présence

continue de BSA dans les différents tampons permet d'éviter la génération d'un signal non-spécifique aléatoire si un amas de BSA se décroche.

Une fois ces paramètres techniques réglés, le signal important des ELISA direct-EVs immobilisées permet d'affirmer la présence des protéines CD63, CD81 et EpCAM à la surface des EVs (*Figure 2.20*). De plus, les anticorps anti-CD63 et anti-CD81 ont fonctionné, indépendamment du fournisseur choisi (**SBI** ou **BD**). Des contrôles négatifs ont été établis pour chaque biomarqueur ciblé en réalisant le test ELISA en l'absence d'EVs. De plus, un contrôle négatif basé ciblant la protéine PDGF, a priori absente à la surface des EVs issues de cellules MCF-7, a été fait.

Toutes les valeurs d'absorbance moyenne sont significativement différentes, ceci étant vérifié à l'aide de test statistique de différences des moyennes (test de Student) en fixant le risque α à 0,05, après vérification de l'égalité des variances. Suite à ces tests statistiques la *p-value* est inférieure à 0,01 traduisant que les moyennes d'absorbance des expériences sont significativement différentes des moyennes d'absorbance des contrôles négatifs.



** : p-value < 0,01 (avec α=0,05) ; test de Student

*Figure 2.20 : Détection d'EVs issues de cellules MCF-7 par test ELISA direct-EVs immobilisées par différents anticorps CD63, CD81 et EpCAM. Histogramme de l'absorbance à 450 nm pour différents marqueurs de surface. Chaque condition représente un total de six valeurs : deux puits par plaque et un total de trois plaques. ** = erreur p < 0,01 avec α = 0,05. Il a été estimé que ces valeurs suivaient une loi normale de façon à réaliser le test de Student.*

Chaque condition est également significativement différente du contrôle négatif utilisant les anticorps anti-PDGF (statistiques non montrées). Pourtant, certaines différences de signaux sont visibles en fonction

de l'anticorps utilisé. En effet, la source (fournisseur) des anticorps peut avoir un effet sur les mesures d'ELISA d'un antigène donné. Elles sont particulièrement visibles concernant les anticorps anti-CD81 qui produisent un signal élevé mais peuvent conduire à une faible spécificité comme en témoignent les anticorps anti-CD81 SBI (*Figure 2.20*). Bien que seulement semi-quantitatif, ce test ELISA permet d'apprécier la similitude du niveau d'expression des protéines CD63, CD81 et EpCAM avec celui des analyses WB (*Figure 2.16*). Ainsi, la protéine CD63 est relativement bien exprimée par les EVs issues de cellules MCF-7 ; la protéine CD81 est fortement exprimée par les EVs issues de cellules MCF-7 et la protéine EpCAM est aussi relativement fortement exprimée par ces vésicules extracellulaires.

3.d. Développement d'un test immunologique ELISA *sandwich* de détection des protéines membranaires des vésicules extracellulaires

Suite à la validation de la détection d'EVs issues de cellules MCF-7 par un protocole propre au projet en ciblant différentes protéines membranaires, l'ELISA *sandwich* avec les anticorps anti-CD63, -CD81 et -EpCAM est réalisé afin de démontrer qu'il est possible de capturer les EVs par des anticorps. Jusqu'à présent, l'immobilisation était réalisée par adsoprtion des EVs en fond de puits. Pour rappel, *in fine*, l'objectif est de prouver qu'il est possible de capturer les EVs en utilisant les sondes aptamères à la place des anticorps, ceci sera abordé dans le **chapitre 3**.

Différentes configurations de capture et de détection pour les anticorps ont été réalisées :

- Configuration 1 : capture par anti-CD81 et détection par anti-CD63
- Configuration 2 : capture par anti-CD63 et détection par anti-CD81
- Configuration 3 : capture par anti-EpCAM et détection par anti-CD81.

Les signaux d'absorbance confirment aussi la capture effective des EVs issues de cellules MCF-7 par les anticorps anti-CD63 et anti-EpCAM (*Figure 2.21*). Des contrôles négatifs avec des anticorps anti-PDGF sont aussi réalisés pour s'assurer de la spécificité des anticorps. Ils sont basés sur l'utilisation d'anticorps non spécifiques contre un marqueur appelé PDGF, soit comme anticorps de capture soit comme anticorps de révélation, et ont donné un signal négatif (*Figure 2.21* en gris) significativement différent (*p-value* < 0,01) de celui obtenu dans les puits de test (*Figure 2.21* en violet, bleu et jaune) selon un test t de Student réalisé avec $\alpha = 0,05$.

Pour la configuration 1 (capture par anti-CD81 et détection par anti-CD63), la valeur moyenne d'absorbance est de 0,2. Tandis que pour les configurations 2 et 3 ciblant par capture respectivement CD63 et EpCAM et en détection CD81 les valeurs moyennes d'absorbance sont comprises entre 0,6 et 0,8 (*Figure 2.21*).

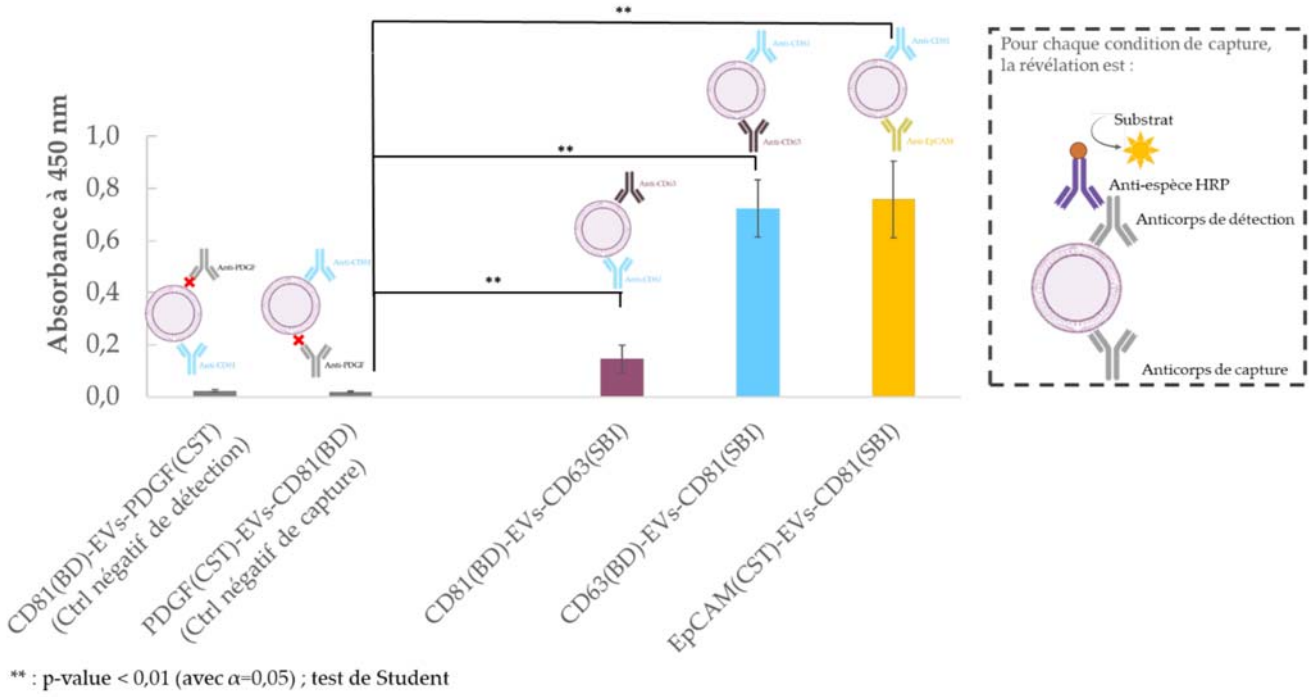


*Figure 2.21 : Détection des EVs par ELISA sandwich. Histogramme de l'absorbance à 450 nm pour différents marqueurs de surface. Chaque condition représente un total de six valeurs : deux puits par plaque et un total de trois plaques. ** = erreur $p < 0,01$ avec $\alpha = 0,05$. Il a été estimé que ces valeurs suivaient une loi normale de façon à réaliser le test de Student.*

Cette différence entre les valeurs d'absorbance de la configuration 1 et celles des configurations 2 et 3 peut s'expliquer par l'abondance relative des différentes protéines à la surface des EVs et la diffusion latérale des protéines membranaires dans la membrane lipidique à l'issue de la capture des EVs. En effet, comme cela a été démontré précédemment par WB et ELISA direct, la protéine CD81 est fortement exprimée tandis que les protéines CD63 et EpCAM sont relativement moins exprimées. Ainsi, en ciblant la capture d'EVs par la protéine CD81, la détection est effectuée par l'anticorps anti-CD63, la protéine correspondante étant moins exprimée résultant donc en un signal plus faible. *A contrario*, immobiliser les EVs à l'aide de protéines moins exprimées (CD63 et EpCAM) n'influencera pas le signal de détection qui va relever de l'anticorps de détection anti-CD81, largement exprimé. Ce phénomène de diffusion latérale des protéines membranaires dans la membrane lipidique est schématisé sur la *Figure 2.22*.

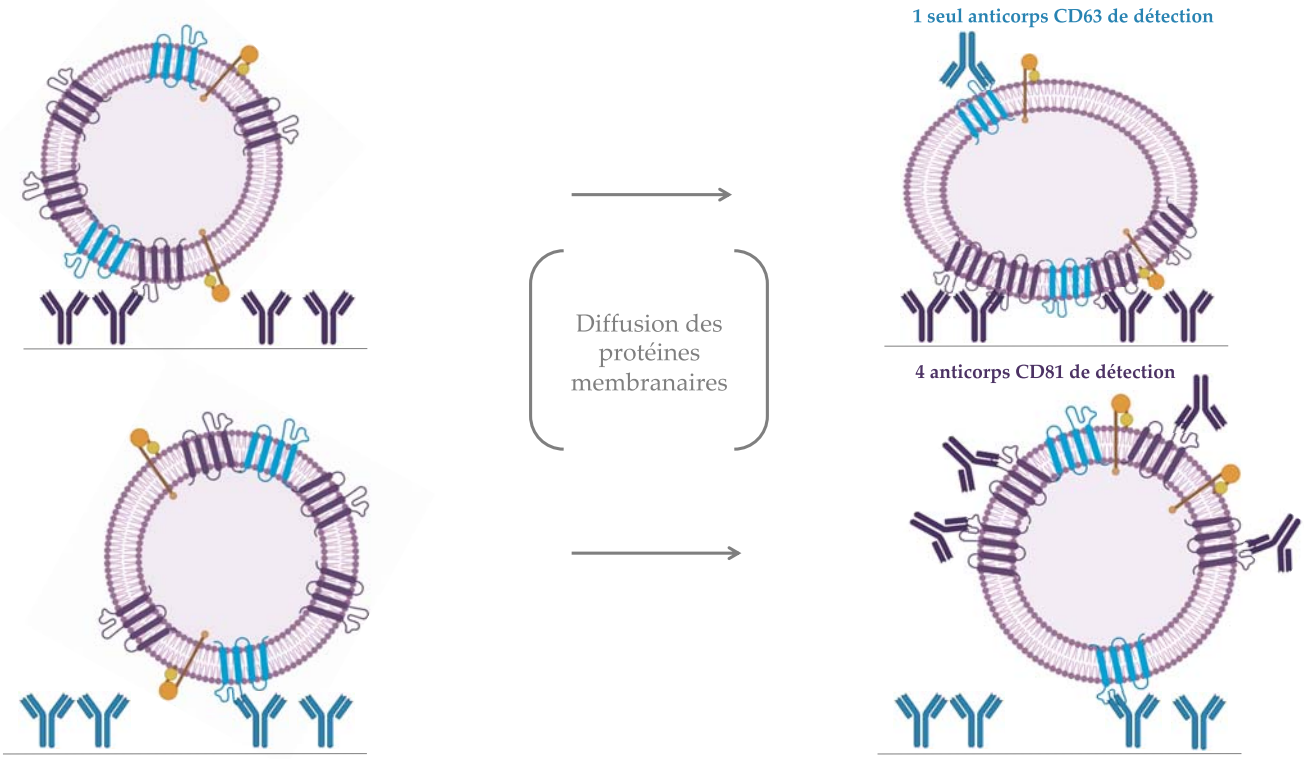


Figure 2.22 : Schéma montrant la diffusion latérale des protéines membranaires dans la membrane lipidique lors du ciblage de biomarqueurs d'intérêt par des anticorps.

Ces schémas expliquent les variations des signaux obtenus par les tests ELISA et permettent de corréler les résultats obtenus avec la théorie des membranes cellulaires assimilable au *fluid mosaic model* énoncée par Singer et Nicolson en 1972[353]. Ce modèle décrit les membranes cellulaires comme des mosaïques au vu de la diversité protéique et lipidique. Les membranes cellulaires sont comme des frontières « fluides » car les composants peuvent se déplacer latéralement par diffusion ou par assemblage spécifique.

La détection des EVs (*via* leurs protéines membranaires) par des anticorps étant validée, l'accroche des EVs par les deux aptamères ciblant, CD63 et EpCAM, peut désormais être envisagée par des tests ELISA en remplaçant les anticorps par ces aptamères comme sondes de capture. Pour information, aucun aptamère ciblant la protéine CD81 n'est à ce jour disponible dans la littérature, bien que cela sera une cible particulèrement pertinente au vu des niveaux d'expression de cette protéine à la surface des EVs.

4. Conclusions

Pour conclure ce chapitre, la recherche de méthodes d'isolement et de caractérisation fiables, reproductibles et applicables aux problématiques liées au projet de recherche a été mise en œuvre dans une première partie. La méthodologie retenue pour l'isolement des EVs est l'UC couplée, en routine, à une caractérisation de leur profil de taille et de concentration par NTA. La cryo-microscopie électronique a permis de démontrer la fiabilité du NTA comme instrument de mesure en taille. La caractérisation protéique des vésicules extracellulaires de différentes lignées cellulaires modèles a été réalisée par WB et ELISA. Les EVs issues de cellules MCF-7 présentent une expression plus importante des biomarqueurs d'intérêt pour ce projet, que les EVs issues de cellules THP-1. Les EVs de cellules MCF-7 sont donc retenues pour la suite des expériences. Finalement, un protocole ELISA de type *sandwich* a été développé afin de démontrer la possibilité de capture et de détection des EVs à travers deux protéines différentes, CD63 et EpCAM. La validation de la capture immunologique des EVs permet donc d'envisager le remplacement des sondes anticorps par les aptamères : ce point sera précisément abordé dans le chapitre suivant.

Résumé – Isolement et caractérisation de vésicules extracellulaires

- Deux méthodes d'isolement des EVs, l'UC et la SEC ont été testées. L'UC permet l'isolement d'une plus grande quantité de vésicules extracellulaires et sera donc retenue pour le protocole standard d'isolement des EVs de ce projet de recherche.

- Différentes méthodes de caractérisation biophysique des EVs ont été envisagées (DLS, TRPS, NTA). Il s'avère que seul le NTA répond entièrement à la problématique de caractérisation d'un échantillon d'objets biologiques nanométriques et polydisperses. Cette technique sera retenue pour le protocole standard de caractérisation des EVs de cette thèse.

- Des images de cryo-microscopie électronique ont permis de valider la taille des EVs obtenues par NTA mais aussi de montrer certains effets indésirables de l'UC sur les échantillons d'EVs. Une méthode d'isolement alternative, sans impact pour l'échantillon biologique, serait intéressante.

- L'étude des protéines exprimées en surface et dans les EVs a été réalisée par WB et ELISA. Enfin, le développement de tests ELISA (direct et *sandwich*) pour la détection d'EVs par différents biomarqueurs (CD63, CD81 et EpCAM) a été mis en œuvre à l'aide d'anticorps, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation de sondes aptamères.

Chapitre 3 : Validation des sondes aptamères pour la capture de vésicules extracellulaires

Chapitre 3 – Validation des sondes aptamères pour la capture d'EVs

- L'intérêt de l'utilisation de sondes aptamères comme sondes alternatives aux anticorps sera présenté. Une définition de ce nouveau type de sonde pour le diagnostic sera établie. Les avantages et les inconvénients des anticorps et aptamères seront présentés. Quelques applications d'*aptasensors* (biocapteurs à base d'aptamères) décrivant la détection d'EVs par des méthodes électrochimiques et optiques seront décrites.

- Trois sondes aptamères spécifiques de biomarqueurs cancéreux ont été choisies et seront évaluées pour la capture d'EVs.

- La validation des sondes aptamères pour la capture d'EVs sera envisagée par adaptation du test ELISA développé au **chapitre 2** en test ELASA (*Enzyme-Linked AptaSorbent Assay*).

Dans ce chapitre, les aptamères seront définis et leur application illustrée à travers différents exemples de biocapteurs utilisant des aptamères pour la détection d'EVs. Des sondes aptamères seront choisies et étudiées en vue de la capture spécifique d'EVs d'intérêt diagnostic. Suite à cela, le développement d'un test ELASA sera réalisé afin de valider ces sondes alternatives pour la capture d'EVs. Finalement, la limite de détection de la capture d'EVs, biomarqueurs cancéreux, dans un échantillon biologique complexe sera déterminée.

1. Les aptamères : de nouvelles sondes pour le diagnostic

1.a. Inconvénients des sondes anticorps

Une grande majorité des tests de diagnostic développés pour la détection de vésicules extracellulaires repose sur une utilisation d'anticorps comme sondes[26,354]. Ces protéines, bien que pouvant cibler un très grand nombre de biomarqueurs, présentent des inconvénients importants quant à leur utilisation dans des systèmes diagnostiques à grand échelle[355]. En effet, leur faible stabilité implique un stockage et une conservation limités. De plus, ces sondes anticorps sont fragiles et sont très sensibles aux variations de température pouvant entraîner une dénaturation irréversible de la protéine [356]. Leur production passe majoritairement par une action *in vivo*, expliquant le coût élevé d'achat et la possible variabilité entre les lots[357]. Finalement, pour toutes ces raisons, les anticorps sont difficilement intégrables dans des systèmes microfluidiques commerciaux[354–356].

1.b. Sondes aptamères

Comme alternative aux anticorps, de nouvelles biomolécules synthétiques émergent. Les aptamères ADN sont des séquences oligonucléotidiques à simple brin avec une structure tridimensionnelle qui leur permet de se lier à une cible spécifique. Ces séquences sont identifiées à partir de banques d'oligonucléotides qui peuvent contenir jusqu'à 10^{15} séquences différentes, par une méthode de sélection combinatoire *in vitro* dénommée SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponentiel enrichment*)[358,359]. C'est sur la base de la reconnaissance cible-sonde que les séquences des aptamères sont sélectionnées. Les principaux avantages de ces molécules sont : une facilité de production inégalée, une très grande stabilité à l'air, des constantes d'affinité similaires à celles des anticorps et une compatibilité avec de nombreux solvants organiques.

1.b.i. Définition et structure

Le terme aptamère est employé pour la première fois par Ellington et Szostak en 1990[359]. Il est formé du mot latin *aptus* signifiant « qui se lie à » et par le suffixe *mer* faisant référence à l'unité de base composant un polymère. Un aptamère désigne une structure d'acide nucléique (ADN ou ARN) monobrin relativement courte (15 à 60 bases) possédant une excellente affinité et spécificité pour des cibles variées : petites molécules organiques, protéines, peptides, acides nucléiques ou encore cellules[359]. L'affinité de l'aptamère pour sa cible est principalement liée aux caractéristiques structurales spécifiques, en particulier par les repliements conformationnels du brin d'acides nucléiques. Ce repliement peut entraîner la formation de doubles hélices (ou tiges) de longueurs variables par l'appariement de régions complémentaires. L'interaction par liaison hydrogène formée entre les bases stabilise alors les deux hélices, menant à la formation d'une conformation tridimensionnelle compacte. Les déformations locales de l'hélice, en exposant certains de ces groupements, permettent de générer une plateforme d'interaction

spécifique avec la cible. Les régions de bases non appariées donnent naissance à différents types de conformations : saillies, jonctions, boucles ou pseudo-noeuds (*Figure 3.1*)[360].

Figure 3.1 : Caractéristiques structurales des aptamères, adapté de Hermann et al.[361].

Le repliement d'un brin sur lui-même donne lieu à une structure « tige-boucle » et des structures secondaires (« pseudo-nœud ») peuvent également se former par interaction de la structure « tige-boucle » avec une structure en simple brin. L'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble sont la conséquence d'interactions entre boucles. L'interaction entre un aptamère et sa cible implique généralement un réarrangement conformationnel de la structure préexistante, et dans certains cas l'adoption d'une nouvelle structure intégrant la cible[361,362]. Une fois formée, la structure du complexe aptamère-cible peut être résolue par diffraction des rayons X ou par l'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)[361,362].

1.b.ii. Méthode de sélection : le SELEX

Développée simultanément par deux équipes en 1990[358,359], la méthode de sélection des aptamères appelée SELEX a permis l'émergence de sondes concurrentielles des anticorps à partir des années 2000[363]. Le principe de cette technique repose sur l'isolement de séquences d'oligonucléotidiques spécifiques de la molécule ciblée à partir d'une bibliothèque aléatoire d'oligonucléotides.

Figure 3.2 : Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé de trois étapes : l'incubation entre la cible et la banque d'oligonucléotides, la sélection des séquences présentant une certaine affinité pour la cible et enfin l'amplification des séquences sélectionnées.

Le cycle SELEX est présenté dans la figure ci-dessus (*Figure 3.2*) et repose sur le criblage d'une grande bibliothèque de séquences d'oligonucléotides aléatoires par un procédé itératif alternant sélection et amplification. La première étape du SELEX nécessite la conception de banques d'oligonucléotides présentant une grande diversité moléculaire. En effet, les séquences de la banque comportent toutes deux

zones communes aux extrémités 5' et 3' et une région variable entre celles-ci constituée de N nucléotides (20 à 100 nucléotides environ) choisis de façon aléatoire parmi les quatre bases (A, T, C et G). La diversité de la banque repose donc sur la taille de cette région. La limite expérimentale de la richesse de la banque est généralement de l'ordre de 10^{13} à 10^{15} séquences différentes[364]. La population de séquences passe ensuite une étape de criblage afin de déterminer l'existence d'affinité pour une cible choisie. Ainsi, la cible d'intérêt est incubée avec la bibliothèque d'oligonucléotides dans des conditions expérimentales définies (tampon et température notamment). Une fraction des séquences interagit avec la cible tandis que la majorité des séquences non-affines est éliminée par séparation physique (chromatographie, filtration ou électrophorèse entres autres). Les séquences sélectionnées sont isolées et amplifiées par PCR. Après identification des ligands retenus par séquençage, les doubles brins d'ADN sont séparés et mis à nouveau en contact avec la cible d'intérêt. Un nouveau cycle de sélection/amplification commence. Ainsi, cette succession d'étapes de sélection et d'amplification peut être réitérée sur une dizaine de cycles afin d'enrichir progressivement la population en séquences disposant des meilleures qualités pour la fonction recherchée. En fin de processus, la diversité de la population se réduit et seulement quelques dizaines de séquences sont retenues pour leurs propriétés de reconnaissance de la cible. L'analyse comparative de ces séquences permet enfin d'en déduire des motifs structuraux critiques pour la propriété souhaitée. Ainsi, des étapes d'optimisation des séquences peuvent être envisagées et visent à réduire les aptamères à moins de 40 oligonucléotides. Il est essentiel de garder à l'esprit que le résultat de cette méthode dépend fortement des paramètres de sélection, telle que la température, le temps d'incubation, le tampon utilisé ou encore la concentration des séquences et de la cible. L'affinité des aptamères sélectionnés peut donc varier voire être altérée s'ils sont utilisés dans d'autres conditions expérimentales ultérieurement.

Le processus global de SELEX dure environ trois mois afin d'obtenir des aptamères fonctionnels pour une cible donnée. De plus, afin de synthétiser les séquences d'oligonucléotides ADN, seulement quelques jours sont nécessaires en utilisant le synthétiseur automatisé. Des entreprises sont désormais spécialisées dans la sélection d'aptamères, c'est le cas de la société **Novaptech** (Bordeaux, France) mais il y a aussi des équipes de recherche académique qui réalisent leur propre développement d'aptamères. Le SELEX est globalement une méthode rapide d'accès à des sondes pour le développement de tests diagnostiques. *A contrario*, la production d'anticorps monoclonaux est longue et coûteuse. Les avantages du SELEX restent à nuancer et la probabilité d'échec de sélection d'un aptamère disposant d'une affinité certaine pour une cible n'est pas à sous-estimer.

1.b.iii. Propriétés

La structure tridimensionnelle particulière propre à un aptamère lui permet de se lier à une cible moléculaire de manière très spécifique et comparable aux interactions mises en jeu entre un anticorps et son antigène correspondant. Les aptamères peuvent aussi être capables d'interagir avec des petites molécules organiques difficilement détectables à l'aide de sondes anticorps car les cibles ne sont pas immunogènes. Enfin, ils peuvent être sélectionnés pour leur affinité pour des toxines. En effet, les anticorps sont relativement complexes à produire *in vivo* pour ces cibles car elles sont, bien souvent, trop immunogènes et létales pour l'animal hôte. Actuellement, la majorité des aptamères sélectionnés est dirigée contre des protéines et représente environ 70% du nombre total d'aptamères sélectionnés[365]. Les aptamères sont produits par synthèse chimique automatisée, rapidement et à coût raisonnable[366]. De plus, un avantage non négligeable de la synthèse chimique est la possibilité de modifier en 5' ou en 3' la

séquence d'acides nucléiques par ajout de groupements fonctionnels tels que des fluorophores. La reproductibilité et les bons rendements de production mettent en avant les avantages indéniables de ces sondes[367,368]. *A contrario* des anticorps, les aptamères sont sélectionnés *in vitro* permettant de s'affranchir de l'utilisation d'animaux, de la variabilité possible lors de sélection *in vivo* et laissent la possibilité de modifier *a volo* la sonde aptamère par des fonctions chimiques. De plus, les aptamères présentent une grande stabilité chimique et peuvent être régénérés facilement après dénaturation répétée, ce qui n'est pas le cas des anticorps. De taille plus petite que les anticorps, 5-20 kDa *versus* 150 kDa, les aptamères sont plus stables dans le temps. La température n'induit pas de modifications irréversibles contrairement aux anticorps. L'affinité des aptamères pour leurs cibles est comparable à celle des anticorps. La force de l'interaction entre sonde et cible peut être appréciée par la valeur de la constante de dissociation (K_D) du complexe aptamère-protéine qui oscille généralement de quelques nanomolaires jusqu'au sub-nanomolaire (10^{-9} à 10^{-11} M), valeur similaire à celle des anticorps. Pour des cibles de poids moléculaire plus faible comme les toxines, la constante de dissociation est de l'ordre du micromolaire (10^{-6} M)[369], ce qui peut s'expliquer par une surface de contact cible-sonde plus réduite. Enfin, la spécificité est une caractéristique remarquable des aptamères envers leurs cibles. Grâce à leur méthode de sélection originale, ils sont capables de discriminer des cibles de formes très proches (énantiomère, ajout ou non d'un groupement chimique méthyle ou hydroxyle …)[362]. Cette spécificité est par ailleurs étroitement liée à l'affinité. Un aptamère ayant une affinitié suffisamment élevée garantit une certaine spécificité pour sa cible[362] démontrant une nouvelle fois l'attractivité de ces nouvelles générations de sondes. Les différentes propriétés des aptamères et des anticorps sont résumées dans le *Tableau 3.1*.

Propriété	Aptamère	Anticorps
Taille	5-20 kDa	~ 150 kDa
Type de production	*in vitro*	*in vivo*
Temps de développement	Mois	Années
Coût de production	Modéré	Elevé
Cibles	Protéines, peptides, petites molécules organiques, toxines	Protéines, peptides uniquement
Étendu des cibles	Quelques Da à plusieurs kDa	Immunogène uniquement
Conservation	Plusieurs années à -20°C	Plusieurs mois à 4°C ou -20°C
Stockage	En solution ou lyophilysé	En solution uniquement
Stabilité	Résistance aux variations de température ; dénaturation réversible	Sensible aux variations de température ; dénaturation irréversible
Affinité	pM à µM	pM à µM

Tableau 3.1 : Tableau comparatif des propriétés des aptamères et des anticorps[365–369].

1.c. Applications

Les aptamères font l'objet de nombreuses applications en cours de développement.

1.c.i. Régulation de l'expression génique

La régulation de l'expression génique peut être envisagée à l'aide d'aptamères. En effet, ces derniers peuvent se lier à des protéines régulant l'expression des gènes. Cela a été observé pour des aptamères dirigés contre des protéines du VIH : Rev et Tat[370]. De plus, les aptamères sélectionnés contre des enzymes peuvent inhiber leur activité catalytique. L'aptamère ciblant la RNaseH1 chez l'humain permet de moduler les effets d'oligonucléotides antisens eux-mêmes régulés par la RNase[371]. Un dernier type de régulation génique des aptamères se rapporte au contrôle sur demande de l'expression d'un gène. En effet, il est possible de contrôler l'expression d'un gène par interaction avec son ligand. Présent au niveau 5' d'un ARNm, l'aptamère pourra réprimer l'expression de la protéine correspondante dans les cellules[372].

1.c.ii. Utilisation dans le monde des biocapteurs : l'exemple des aptasensors *à vésicules extracellulaires*

Leur utilisation notamment dans le domaine des biocapteurs est grandissante, conférant aux aptamères un rôle de sondes alternatives aux sondes anticorps. Une sonde de type aptamère dispose de trois états conformationnels : libre, liée à sa cible ou dénaturée. En effet, l'association d'un ligand à sa cible s'accompagne très souvent d'un changement structural. Ainsi, si l'on est capable de détecter ce changement de conformation, on détient alors un biocapteur dénommé *aptasensor*. Cette propriété des aptamères est largement exploitée et a permis le développement de nombreux systèmes de détection à base de fluorescence entre autres. Cependant, il est important de ne pas modifier la conformation de l'aptamère lors de son interaction avec la cible pendant de l'introduction du groupement chimique aux extrémités de l'aptamère. L'ajout de fluorophores, ou de motifs chimiques tels que la biotine, est à réaliser à distance de la séquence aptamère en ajoutant par exemple un espaceur. Une autre alternative consiste à introduire une base modifiée dans la séquence de l'oligonucléotide. Des aptamères notamment fluorescents reconnaissant l'adénosine ont ainsi été sélectionnés[373].

En parallèle des *aptasensors* en solution, de très nombreuses méthodes de détection ont aussi été développées par immobilisation des aptamères sur surface pour la détection de ligands en utilisant par exemple la SPR ou l'électrochimie[374]. Des puces à aptamères (dénommées aussi *microarrays*) ont également été développées pour détecter la présence de protéines dans un échantillon biologique complexe par exemple[375]. Ce type de dispositif appliqué pour la détection d'EVs est en plein essor[26].

Soit X un antigène d'intérêt, par analogie avec les anticorps, il convient d'aborder l'aptamère anti-X lorsqu'il s'agit d'un aptamère d'ADN spécifique à X. Toutefois, comme cela a été fait dans la littérature, l'écriture sera désormais simplifiée en « aptamère X ».

Afin d'avoir une vue d'ensemble des biocapteurs à base d'anticorps, d'aptamères et de peptides pour la détection d'EVs, un article de revue a été rédigé en 2020[26]. Dans ce manuscrit, seuls quelques exemples extraits de la revue seront illustrés.

En 2016, le groupe d'Alexander Revzin[256] a été le premier à développer un biocapteur basé sur un aptamère ADN pour la détection d'EVs. Cet *aptasensor* électrochimique est composé d'un réseau d'électrodes en or

à motifs insérés dans une chambre d'écoulement microfluidique. Dans un premier temps, les aptamères CD63 sont immobilisés sur la surface de l'or par leur extrémité thiol. Ensuite, une sonde complémentaire, couplée à un groupement redox, est hybridée avec l'aptamère CD63, permettant ainsi la transmission d'un signal électrochimique. Les EVs sont injectées dans la chambre fluidique où elles interagissent avec les aptamères, déclenchant la libération de la sonde et la diminution du signal électrochimique. Dans une telle configuration, la modification du signal électrochimique est directement liée à la concentration de l'analyte atteignant une limite de détection (LOD) de $1x10^6$ EVs/mL. D'autres types d'*aptasensors* ont aussi été développés, notamment les *aptasensors* colorimétriques. En effet, ce type de signal permet une interprétation facile du biocapteur et ainsi possiblement transposable dans un laboratoire d'analyse. Dans ce contexte, Xia *et al.* ont fonctionnalisé des nanotubes de carbone à simple paroi avec un aptamère CD63 pour concevoir un biocapteur pour la détection des EVs, où la détection est visible à l'œil nu par changement de couleur de la solution[258]. L'aptamère CD63 a été absorbé sur la surface des nanotubes de carbone par des interactions non covalentes. En présence d'EVs, l'aptamère CD63 se lie aux EVs et subit un changement conformationnel. Sous cette nouvelle forme, les nanotubes de carbone ont une activité de dégradation du dihydroxyde d'oxygène. Les nanotubes de carbone reviennent ensuite à leur état initial et la dégradation catalytique du dioxyde d'hydrogène diminue, induisant un changement de couleur de la solution (translucide à bleu turquoise par utilisation du substrat TMB) qui peut être observé soit à l'œil nu, soit au moyen d'un spectromètre UV-visible, comme le montre la figure ci-dessous (*Figure 3.3*). En développant ce type de biocapteur, l'équipe de recherche a construit le premier *aptasensor* sans immobilisation des EVs. L'utilisation d'aptamères à la place d'anticorps a permis d'améliorer la stabilité et la sensibilité du système et de réduire les coûts de production. Le processus d'amplification enzymatique a permis d'atteindre une LOD de $5x10^8$ EVs/mL. La stratégie de *signal-off* (couleur bleue lorsqu'il n'y a pas d'EVs) et de *signal-on* (solution transparente) visible à l'œil nu est prometteuse pour les applications POC. Cependant, ces nanotubes en carbone sont un risque biologique potentiel et ne sont pas encore totalement approuvés pour une manipulation en dehors d'un environnement de laboratoire.

Figure 3.3 : Nanotubes de carbone fonctionnalisés par des aptamères pour la détection des EVs. Le changement de couleur de la solution peut être observé à l'œil nu, adapté de Xia et al.[258].

À ce jour, peu de publications rapportent l'utilisation de la colorimétrie pour la détection d'EVs à base d'aptamères. L'utilisation de la colorimétrie est courante dans les dispositifs de diagnostic et s'avère particulèrement simple. Ces types d'*aptasensors* sont intéressants et prometteurs pour des développements futurs.

1.c.iii. Émergence de méthodes d'isolement de vésicules extracellulaires par aptamères

Combiner l'isolement et la détection dans le cadre d'un même protocole est un défi technique de taille. À l'heure actuelle, trois articles utilisant des protéines de surface ont fait état de moyens très prometteurs pour isoler et détecter les EVs.

Wang *et al.* ont combiné des billes magnétiques, des nanoparticules (NPs) d'or fonctionnalisées par des aptamères CD63 et une molécule rapporteur Raman[376]. Ils ont choisi trois aptamères ciblant trois protéines différentes (PSMA, CEA et HER2), tous les trois des marqueurs cancéreux. Un complexe est formé entre les nanoparticules (NPs) d'or et les billes magnétiques prenant en *sandwich* les EVs en ciblant deux aptamères différents. Le complexe a ensuite été isolé à l'aide d'un aimant, puis détecté par spectroscopie Raman. En une seule étape et avec une seule solution, ils ont ciblé différentes espèces d'EVs et obtenu des résultats prometteurs pour des applications diagnostiques. En parallèle, une application à la méthode d'isolement par échange d'anions est développée. Chen *et al.* ont appliqué cette stratégie pour isoler les EVs[377] : des billes magnétiques échangeuses d'anions décorées d'aptamère EpCAM ont été incubées dans du plasma et des milieux de culture cellulaire. La phosphatidylsérine chargée négativement présente sur les membranes des EVs permet la formation d'un complexe avec les billes magnétiques.

Une stratégie particulièrement intéressante est celle envisagée par Zhang *et al.* à base de billes magnétiques couplées à des aptamères pour l'isolement et la libération des EVs[378]. Des aptamères CD63 ont été greffés

sur des billes magnétiques permettant la capture des EVs. Pour libérer ces dernières de manière non destructive, une séquence complémentaire d'ADN à l'aptamère a été ajoutée (*Figure 3.4*). De plus, ils ont testé les niveaux d'expression de biomarqueurs dans différents échantillons de plasma en utilisant différents aptamères de ciblage, ce qui a permis une étape préliminaire de diagnostic post-isolement. Ils ont pu démontrer que l'expression de MUC1 (marqueur cancéreux) était significativement plus élevée chez des patients cancéreux que l'expression de CD63 (marqueur constitutif).

Figure 3.4 : Capture et libération d'EVs à l'aide de billes magnétiques couplées à des aptamères CD63. Grâce à une séquence complémentaire à l'aptamère, les EVs peuvent être libérées de manière non destructive, adapté de Zhang et al.[378].

À ce jour, l'émergence de l'utilisation des sondes aptamères pour l'isolement d'EVs reste basée sur seulement quelques publications. Cependant, le potentiel des aptamères est prometteur ; à la fois par la capture spécifique mais surtout par la possibilité de relargage contrôlé et non-destructif.

2. *Design* de sondes aptamères pour une capture efficace et un relargage contrôlé

Les sondes aptamères utilisées dans la littérature pour cibler les protéines de surface des EVs sont au nombre de dix environ. Ces aptamères ciblent des protéines membranaires à la surface des EVs et ont été sélectionnés par la méthode SELEX. La publication de Jiang *et al.*[379] apparaît particulièrement intéressante pour son utilisation multiplexée de différentes sondes aptamères ciblant notamment les protéines CD63 et EpCAM.

En effet, comme rapporté dans le **chapitre 1**, la protéine CD63 est une tétraspanine exprimée de façon constitutive dans les EVs. Ainsi, dans l'objectif de caractériser les sous-populations d'EVs exprimant les tétraspanines (exosomes), deux aptamères ciblant CD63 dont les séquences ont été extraites de publications, ont été retenus[256,380]. Ces aptamères seront considérés comme une sonde « générique » exprimée constitutivement par les EVs.

En parallèle, le dispositif DLD étant à visée diagnostique, cibler des biomarqueurs surexprimés dans certaines pathologies est une approche intéressante pour qualifier et quantifier l'expression de ces derniers. L'aptamère EpCAM[381] a été sélectionné pour cibler ce biomarqueur cancéreux exprimé dans certains types de cancers[382]. Cibler cette protéine permet de sélectionner une sous-population d'intérêt pour l'établissement d'un diagnostic cancéreux à partir d'une biopsie liquide. Cet aptamère sera considéré comme une sonde « spécifique ».

Les séquences d'aptamères utilisées ont été choisies d'après la littérature et en se rapprochant des conditions d'utilisations décrites par les différentes équipes de recherche afin de s'assurer de la spécificité des sondes pour leurs cibles. Cela permet de disposer de sondes robustes envers les EVs. Les conditions de sélection des aptamères, à savoir pH, tampon, concentration saline, température notamment, représentent les conditions expérimentales de référence car elles assurent la conformation structurelle de l'aptamère permettant la reconnaissance de sa cible. Les séquences des aptamères ainsi que les conditions sont rapportées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 3.2*).

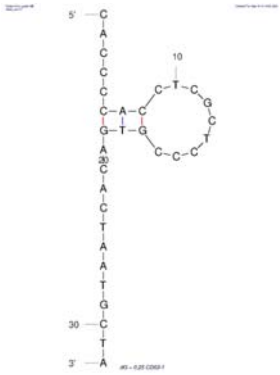
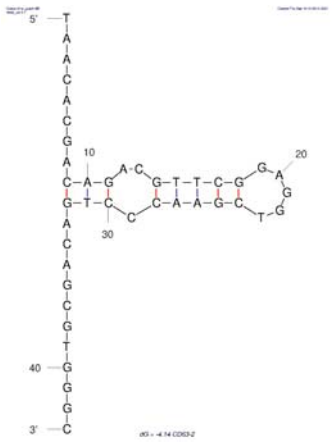
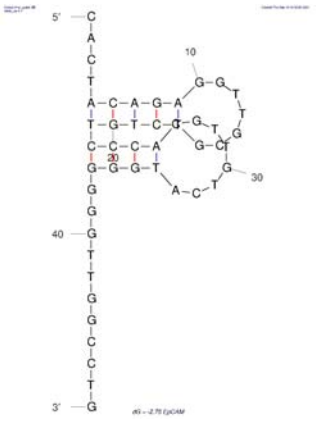
Aptamères	Cible	Séquence (5′-3′) Structure *mFold*	Nombre de bases	Tampon	Température de sélection
CD63-1	CD63	CAC CCC ACC TCG CTC CCG TGA CAC TAA TGC TA 	32	PBS + 1mM $MgCl_2$	Non précisé
CD63-2	CD63	TAA CAC GAC AGA CGT TCG GAG GTC GAA CCC TGA CAG CGT GGG C 	43	PBS + 2mM $MgCl_2$	25°C
EpCAM	EpCAM	CAC TAC AGA GGT TGC GTC TGT CCC ACG TTG TCA TGG GGG GTT GGC CTG 	48	PBS + 5mM $MgCl_2$	37°C

Tableau 3.2 : Séquences d'aptamères utilisées, caractéristiques et structures conformationnelles des aptamères modélisées à l'aide du logiciel mFold[256,380,381,383].

Afin de permettre à la conformation tridimensionnelle de l'aptamère de se replier sans être influencée par la proximité de la surface de greffage, un bras espaceur « polyT » de cinq bases est ajouté en position 5' ainsi qu'une fonction biotine. Les aptamères rapportés sont utilisés dans des conditions similaires, dans un tampon PBS avec un ajout de chlorure de magnésium (1 à 5 mM). En effet, les cations divalents (Mg^{2+}) permettent la stabilisation de l'aptamère dans sa conformation structurelle d'intérêt par l'établissement d'interaction électrostatique avec les charges négatives portées par l'oligonucléotide *via* son squelette phosphate.

La nature des aptamères permet de leur conférer deux conformations possibles (libre ou repliée) et exploitées dans ce projet. Cet avantage permet d'envisager la stratégie de relargage contrôlé des EVs présentée au début de ce manuscrit et sera présentée plus en détail dans les **chapitres 4 et 6**. Suite au *design* des séquences aptamères d'intérêt, l'étude de la capture pour les EVs de ces sondes est réalisée.

3. Validation de la performance des sondes aptamères immobilisées pour la capture et la caractérisation de vésicules extracellulaires en vue de leur relargage contrôlé

Au **chapitre 2**, la capture par des anticorps en *sandwich* d'EVs issues de cellules MCF-7 en ciblant deux protéines d'intérêt (CD63 et EpCAM) a été démontrée. Ces deux biomarqueurs disposent de sondes aptamères spécifiques ; puisque deux aptamères ciblant CD63 ont été développés respectivement en 2016 et 2020[256,380] (CD63-1 & CD63-2) afin de cibler les vésicules extracellulaires. D'autre part, un aptamère ciblant EpCAM a été développé en 2013 afin de cibler les CTCs mais la protéine étant aussi présente dans les EVs de lignées cellulaires cancéreuses, il permet donc potentiellement la capture d'EVs portant la protéine EpCAM, notée $EpCAM^+$.

D'après les conclusions tirées quant à l'expression des biomarqueurs d'intérêt au chapitre précédent, les validations des aptamères seront établies à partir d'EVs isolées par UC à partir de cellules MCF-7.

3.a. Développement d'un test ELASA pour la capture de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7

Les expériences précédentes ont validé le développement d'un test ELISA *sandwich* avec un anticorps de capture (anti-CD63 ou anti-EpCAM) et un anticorps de détection (anti-CD81). Afin d'évaluer les sondes aptamères comme sondes de capture, le test a été adapté à un format ELASA (*Enzyme-Linked AptaSorbent Assay*). Ce type de test résulte du remplacement de la sonde de capture immunologique par une sonde de capture aptamère (*Figure 3.5*).

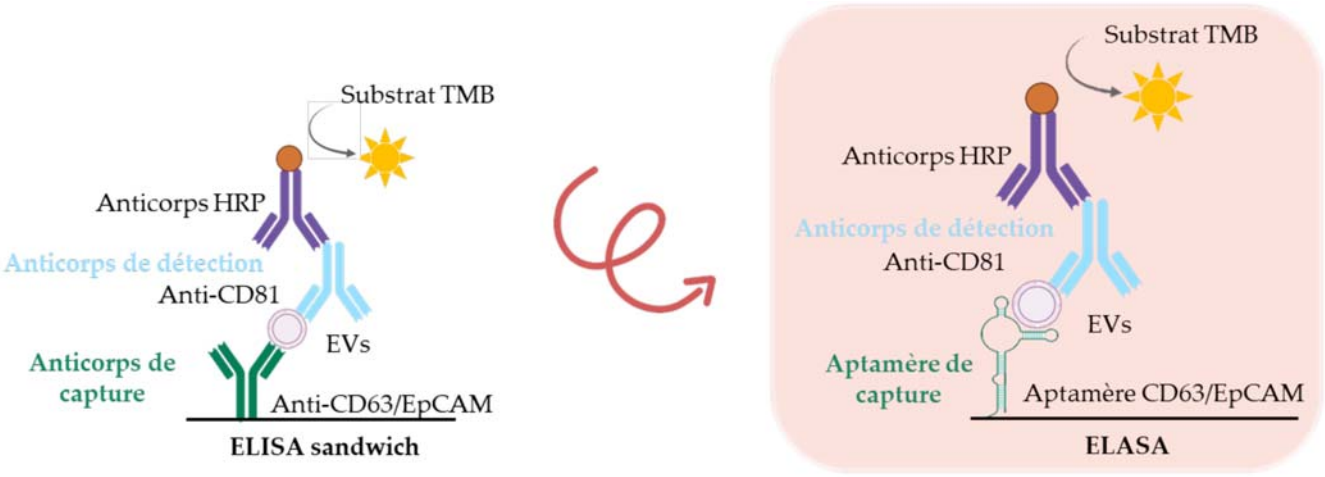


Figure 3.5 : Du test ELISA au test ELASA.

Le greffage des sondes anticorps de capture s'effectuait par adsorption des protéines dans un tampon basique (carbonate/ bicarbonate pH = 9,6) dans la plaque 96 puits. Les aptamères sont des oligonucléotides ADN et ne s'adsorbent que faiblement en fond de puits. De plus, il est important de noter que les tests ELISA ont été développés dans des plaques à puits Nunc MAXISORP® optimisées pour la capture de protéines. Bien que ce paramètre puisse, au premier abord, paraître anodin, le type de plastique utilisé est important à considérer et influe notamment sur le greffage protéique et le blocage à la BSA. Dans le cas de l'ELASA, la plaque 96 puits a été fonctionnalisée avec de la streptavidine pour favoriser l'accroche streptavidine-biotine des aptamères en fond de puits. Cette dernière a été déposée à 0,5 µg/mL dans un tampon carbonate/bicarbonate pH = 9,6 et adsorbée en fond de puits en quelques heures à 37°C. Les modifications des sondes aptamères ont été effectuées par ajout d'une molécule de biotine en 5' des séquences aptamères. L'interaction biotine-streptavidine est décrite comme l'une des plus fortes interactions non-covalentes ($K_D = 10^{-14}$ M) et est aujourd'hui utilisée dans un grand nombre d'applications de biotechnologies[384]. Ainsi, la fonctionnalisation de la plaque 96 puits, support du test ELASA, a été réalisée par fixation de l'aptamère par interaction streptavidine-biotine.

A contrario des sondes anticorps, et comme décrit dans la partie 1 de ce chapitre, une conformation structurale précise permet la capture des cibles à la sonde. Pour cela, une étape préalable consiste à s'assurer que l'aptamère est dans cette conformation. Cette structure est généralement la conformation de plus basse énergie, donc la plus stable. Cette étape de « mise en forme » de l'aptamère est basée sur le tampon de sélection et une étape rapide de chauffage durant 3 minutes à 90°C ainsi qu'une rampe de température décroissante jusqu'à 25°C durant 30 minutes. Trois différentes sondes de capture, CD63-1, CD63-2 et EpCAM ont été testées afin de capturer les EVs issues de cellules MCF-7. L'aptamère CD63-1 est utilisé dans un tampon PBS + 1 mM $MgCl_2$; l'aptamère CD63-2 dans un tampon PBS + 2 mM $MgCl_2$ et l'aptamère EpCAM dans un tampon PBS + 5 mM $MgCl_2$. Une fois ces quelques spécificités liées à l'ELASA faites, le test a été réalisé en suivant les mêmes étapes que le test ELISA à quelques modifications de protocole près. L'étape d'incubation des EVs est réalisée à 37°C. Le blocage du signal non-spécifique est mis en œuvre en 1 heure dans du PBS supplémenté avec 1% de BSA. La détection est réalisée en ciblant les protéines constitutives CD81 par l'anticorps anti-CD81, lui-même révélé par un anticorps anti-espèce HRP. Un élément important à noter est la réduction du temps d'incubation des anticorps de détection (anti-CD81 et anti-espèce HRP). Classiquement, dans le test ELISA, ce temps est fixé à 1 heure. Cependant,

dans le test ELASA, le temps d'incubation des anticorps de détection a été réduit à 10 minutes et les rinçages ont aussi été diminués. En effet, la capture d'EVs par les aptamères est dépendante de la valeur de la constante d'affinité de l'aptamère utilisée, K_D, elle-même relative au ratio des constantes d'association et de dissociation, respectivement k_{ON} et k_{OFF}, de la sonde pour sa cible. Dans le cadre des aptamères, ces valeurs de constantes k_{ON} et k_{OFF} sont plus élevées. La reconnaissance des EVs par les aptamères est donc mobile et varie continuellement entre association et dissociation pour une même valeur de K_D. Comme le k_{OFF} est élevé, le nombre de rinçage va influer considérablement sur l'accroche aptamères-EVs : plus le rinçage sera important plus le risque de décrocher les EVs des aptamère sera élevé. Une réduction du nombre de rinçage a été mise en œuvre. De plus, le fait que le k_{ON} soit lui aussi élevé va permettre de réduire les temps d'incubations du test ELASA. Ceci est un avantage indéniable des aptamères et permet donc de développer un test plus rapide que son homologue à base d'anticorps. Finalement, le substrat TMB de l'enzyme HRP est ajouté et l'absorbance résultante est lue à 605 nm après 30 minutes de réaction. Le protocole complet est décrit en annexe.

Les résultats de capture des EVs par les aptamères CD63-1, CD63-2 et EpCAM, ainsi mis en œuvre, sont présentés sur la *Figure 3.6*.

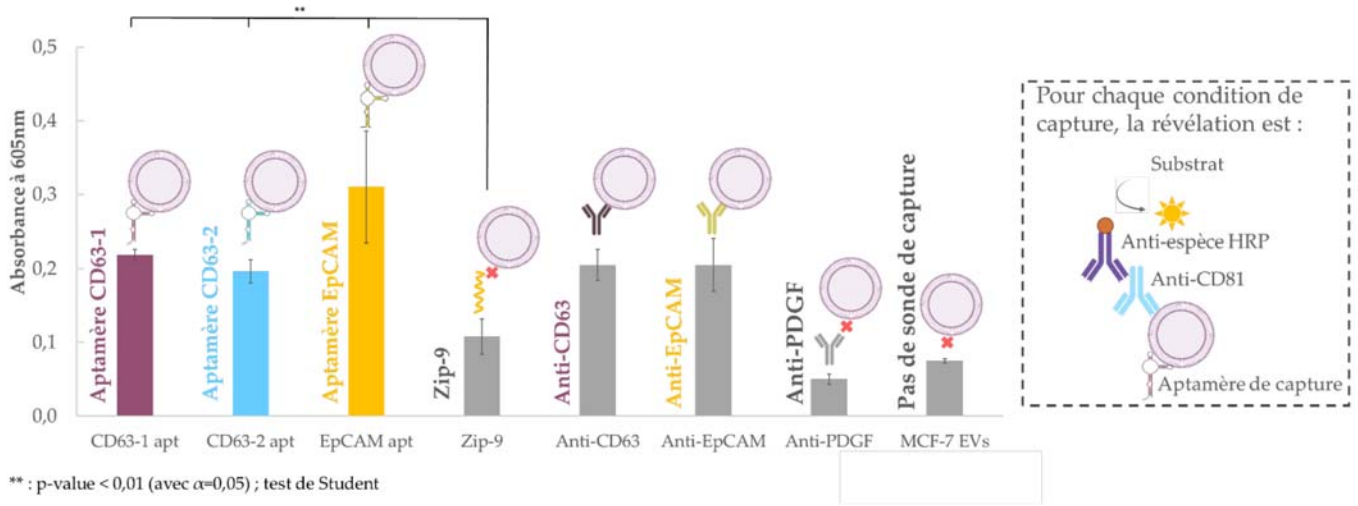


*Figure 3.6 : Capture des EVs issues de cellules MCF-7 par ELASA. Histogramme de l'absorbance à 605 nm pour différents marqueurs de surface. Les contrôles sont grisés. Chaque condition représente un total de six valeurs : deux puits par plaque et un total de trois plaques. ** = erreur $p < 0,01$ avec $\alpha = 0,05$. Il a été estimé que ces valeurs suivaient une loi normale de façon à réaliser le test de Student.*

Les différents signaux de l'ELASA permettent d'affirmer que la capture d'EVs issues de cellules MCF-7 est possible en utilisant les aptamères CD63-1, CD63-2 et EpCAM (*Figure 3.6*). Le contrôle avec une séquence d'oligonucléotides aléatoire (Zip9) est réalisé démontrant la spécificité des sondes aptamères. Les valeurs d'absorbance moyenne sont significativement différentes du contrôle négatif, ceci a été vérifié à l'aide de test statistique de différences des moyennes (test de Student) en fixant le risque $\alpha = 0,05$. Suite à ces tests statistiques, la *p-value*, probabilité pour laquelle la variable aléatoire se situe dans un intervalle de valeurs, est inférieure à 0,01, traduisant que les moyennes d'absorbance des expériences sont différentes des moyennes d'absorbance des contrôles négatifs. De plus, différents contrôles ont été réalisés

pour démontrer notamment le greffage des aptamères dans les puits mais aussi la spécificité des aptamères pour les protéines d'intérêt (*Figure 3.6* et *Figure 3.7*).

Figure 3.7 : Contrôles liés au développement du test ELASA. Histogramme de l'absorbance à 605 nm.

Une comparaison de la capture des sondes aptamères avec les sondes anticorps a aussi été réalisée pour vérifier l'efficacité des aptamères. Les valeurs d'absorbance des puits avec la capture par aptamères (barres violette ; bleue et jaune de la *Figure 3.6*) sont au moins égales voire supérieures aux valeurs d'absorbance correspondantes des puits contrôles avec les anticorps anti-CD63 et anti-EpCAM en sonde de capture. Ceci confirme donc le potentiel intéressant des aptamères comme sondes alternatives dans le domaine des biocapteurs. Pour rappel, leur potentiel de relargage des cibles préalablement capturées est un des intérêts principaux des aptamères.

Le développement de ce test ELASA a été long à mettre en œuvre (plusieurs mois) et un grand nombre de paramètres ont été évalués. La température d'incubation des EVs, les tampons des aptamères, les temps d'incubation des sondes … ont été investigués et ont permis le développement de cette stratégie de test ELASA pour la validation des sondes aptamères pour la capture d'EVs. Cette validation a été une étape majeure du projet de thèse. Les aptamères sont des sondes permettant une mise en œuvre facilitée de la capture des EVs car les protocoles associés nécessitent moins de rinçage, des temps d'incubation réduits … De plus, les signaux d'absorbance de capture des EVs par les aptamères sont similaires à ceux obtenus avec l'utilisation d'anticorps traduisant une capacité de capture similaire des EVs. Le bénéfice des aptamères par rapport aux anticorps est majeur. Les propriétés de relargage, le second bénéfice majeur des aptamères, seront validées ultérieurement dans les **chapitres 4 et 6**.

3.b. Évaluation de la stabilité temporelle de vésicules extracellulaires par test ELASA

Cette étape de validation d'aptamères pour la capture d'EVs a été une étape clé dans le déroulement de ce projet de thèse. Néanmoins, elle soulève différentes questions quant aux EVs capturées. La stabilité temporelle de l'échantillon, c'est-à-dire la durée entre l'isolement d'EVs par UC et leur utilisation en ELASA, va-t-elle influer sur la performance de la capture des EVs par les aptamères ? Jusqu'à quelle

concentration d'EVs issues de cellules MCF-7, la capture par aptamères est-elle détectable par test ELASA ? Ces points ont été investigués, et les résultats sont détaillés dans les paragraphes suivants.

Une fois isolées, les EVs se dégradent comme cela a été démontré au **chapitre 2** par l'analyse de l'intégrité physique. Qu'en est-il de l'altération des biomarqueurs à leur surface ? Une évaluation de l'étude de la stabilité temporelle de l'échantillon d'EVs pour la capture par aptamères par test ELASA a été réalisée. La stabilité temporelle de l'échantillon d'EVs est considérée comme la stabilité pendant le temps durant lequel, l'échantillon a été isolé et conservé à -20 °C. Chaque échantillon a été isolé puis conservé à -20°C durant le temps indiqué. L'étude a été menée à trois intervalles de temps différents : J+1 ; J+8 et J+60 en fixant le jour de l'isolement d'EVs comme J0.

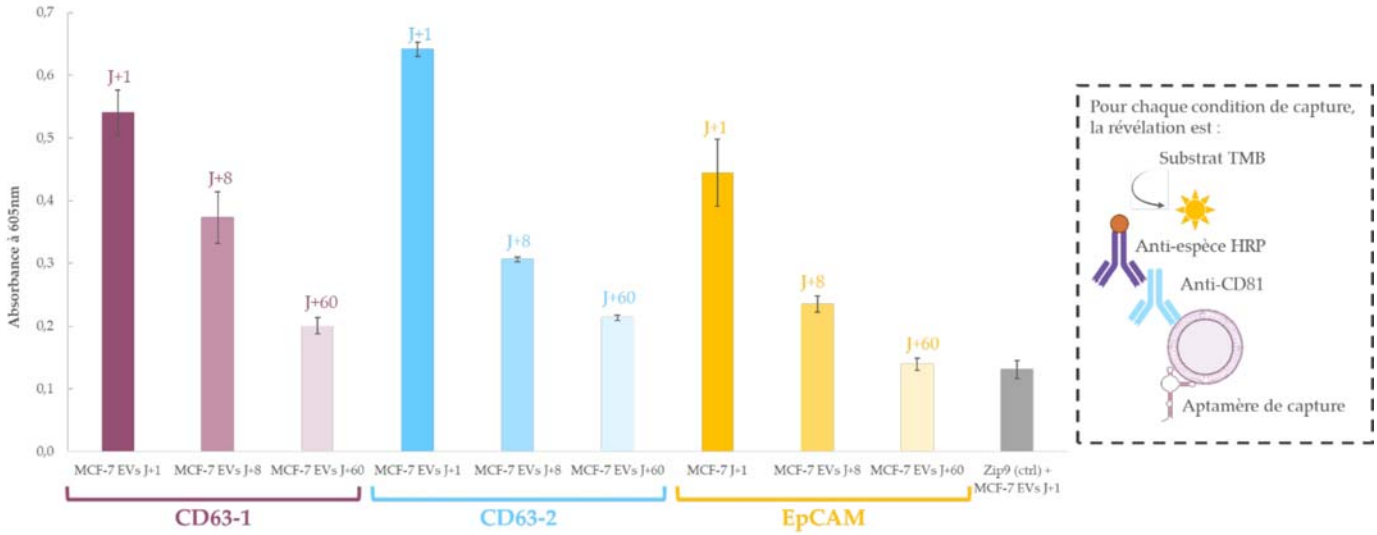


Figure 3.8 : Détection d'EVs issues de cellules MCF-7 en fonction de la stabilité temporelle par test ELASA. Histogramme de l'absorbance à 605 nm. Le contrôle est grisé. Chaque condition représente un total de quatre valeurs : deux puits par plaque et un total de deux plaques.

La *Figure 3.8* montre l'évolution de la capture par les aptamères CD63-1, CD63-2 et EpCAM d'EVs par test ELASA en fonction de la stabilité temporelle de l'échantillon pour une même quantité d'EVs. A J+8, les signaux d'absorbance diminuent de 30 à 50 % par rapport au signal de référence J+1. À J+60, les signaux d'absorbance des trois aptamères de capture deviennent légèrement supérieurs ou équivalents au signal du contrôle négatif avec la sonde d'oligonucléotide aléatoire (Zip9). Ceci démontre que le temps de conservation à -20°C influe sur l'intégrité des EVs et des biomarqueurs. L'intégrité physique des EVs a été vérifiée en fonction de la durée de conservation à -20°C par NTA dans le **chapitre 2** et la conservation à -20°C n'a pas d'influence physique sur l'échantillon d'EVs jusqu'à 90 jours après isolement. Cependant, la question de l'intégrité biochimique n'avait pas été résolue. Par cette évaluation, les résultats obtenus permettent de conclure à une dégradation des protéines membranaires des EVs conservées à -20°C. Cela permet aussi de conclure que la capture des EVs par les aptamères est d'autant plus efficace que l'isolement de l'échantillon associé est proche temporellement.

3.c. Évaluation de la limite de détection de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 dans un échantillon biologique complexe par test ELASA

Afin de s'approcher des conditions réelles de diagnostic de biomarqueurs cancéreux à partir d'EVs contenues dans le sang, l'utilisation d'un échantillon biologique complexe contenant des EVs issues de cellules MCF-7 apparaît intéressant. Ce test ELASA permet l'évaluation de la limite de détection de la

capture d'EVs issues de cellules MCF-7. Pour cela, l'isolement d'EVs issues de cellules MCF-7 a été classiquement réalisé par UC. Cependant, *a contrario* des autres expériences où le tampon de dilution était le PBS, la dilution des EVs issues de cellules MCF-7 a été réalisée soit dans un échantillon d'EVs issues de la lignée cellulaire THP-1, soit dans un échantillon de plasma, contenant naturellement des EVs, dilué au dixième. Ainsi, le biomarqueur cancéreux d'intérêt EpCAM est dilué dans un échantillon contenant un grand nombre d'EVs différents et de biomarqueurs. Les EVs issues de cellules MCF-7 portant la protéine EpCAM sont donc diluées dans l'échantillon d'EVs issues de cellules THP-1 ou dans le plasma. Une évaluation de la capture de ces EVs MCF-7 EpCAM$^+$ dans un échantillon biologique complexe par détection grâce à un test ELASA a donc été réalisée (*Figure 3.9*). La mise en œuvre est inspirée de celle réalisée au paragraphe 3.a. Le pourcentage d'EVs issues de cellules MCF-7 (présentant potentiellement la protéine EpCAM) parmi le nombre total d'EVs présents dans l'échantillon biologique complexe est défini comme le ratio des nombres d'EVs dans les populations d'intérêt telles qu'évalué par analyse NTA. Ceci a permis d'appréhender la LOD des EVs MCF-7 EpCAM$^+$ en fonction de la quantité des EVs issues de cellules MCF-7 ajoutées dans un échantillon biologique complexe.

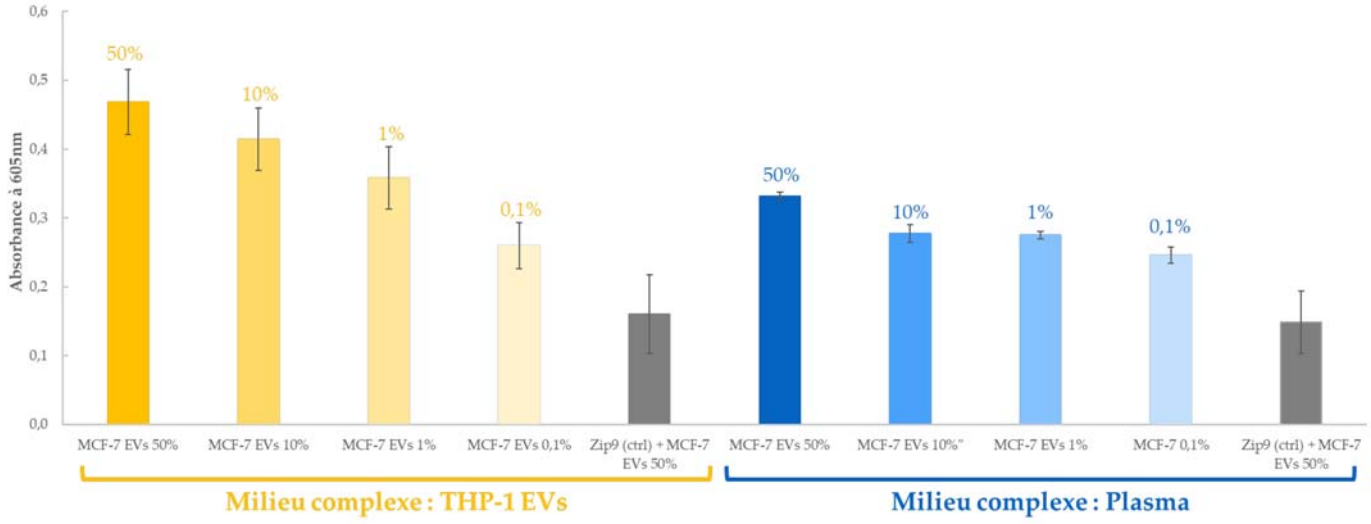


Figure 3.9 : Evaluation de la limite de détection de capture d'EVs MCF-7 EpCAM$^+$ en milieu biologique complexe par test ELASA. Histogramme de l'absorbance à 605 nm. Les contrôles sont grisés. Chaque condition représente un total de quatre valeurs : deux puits par plaque et un total de deux plaques.

Les EVs issues de cellules MCF-7 représentent respectivement 50% ; 10% ; 1% et 0,1% de l'échantillon biologique total testé par ELASA. À la fois pour la dilution dans les EVs issues de cellules THP-1 et dans le plasma, on observe une diminution du signal de détection avec la diminution de la quantité d'EVs issues de cellules MCF-7 présentes dans l'échantillon biologique complexe. Des valeurs d'absorbance plus faibles sont rapportées dans le cas de la dilution dans le plasma. Ceci pourrait être dû à une plus grande complexité d'échantillon et donc un test ELASA moins sensible par la présence de contaminants. Une estimation de la valeur de LOD est d'environ 10^6 EVs/mL. Cette valeur est similaire à une grande majorité des LOD obtenues dans le domaine des *aptasensors*[26] et est compatible avec les concentrations d'EVs contenues dans un échantillon sanguin[141]. De plus, l'estimation de la proportion d'EVs cancéreux est importante en cas de progression de cancer[385], cette approche à base d'aptamères apparaît d'autant plus intéressante dans le développement de dispositifs diagnostiques. Ces résultats démontrent une nouvelle fois l'intérêt du tri biomarqueur-spécifique d'EVs.

4. Conclusions et Perspectives

Le développement d'un test ELASA a permis la validation de la capture des EVs issues de cellules MCF-7 par les trois aptamères retenus et ciblant les protéines CD63 et EpCAM. L'utilisation de ces sondes, comme alternatives aux anticorps, a permis d'élaborer un protocole plus simple et plus rapide que le test ELISA correspondant avec une spécificité au moins égale aux sondes anticorps. Finalement, l'évaluation de la limite de détection de la capture d'EVs $EpCAM^+$ en milieu biologique complexe a permis de démontrer la possibilité de détection d'EVs cancéreux représentant seulement 0,1% de la population totale dans un milieu complexe tel que le plasma.

Ces résultats prometteurs ouvrent la voie à l'utilisation des aptamères pour la capture d'EVs spécifiques en s'affranchissant de l'utilisation d'anticorps. Intégrer ces sondes dans des dispositifs POC apparaît intéressant à la fois en termes de simplicité d'utilisation et de spécificité envers les cibles d'intérêt. En effet, leurs propriétés uniques, production à bas coût, molécules lyophilisables, grande sensibilité et spécificité, sont des atouts particulièrement appréciés dans le monde du diagnostic[386]. Bien qu'encore peu développés, quelques systèmes microfluidiques intégrant les aptamères pour la détection ou l'isolement d'EVs ont été décrits[387]. Néanmoins, bon nombre de systèmes *Lab-on-Chip* développés avec des anticorps pourraient être transposés avec des aptamères pour faciliter le transfert technologique vers les industriels et l'utilisation au chevet du patient[388]. Ces éléments permettent ainsi de conforter la stratégie de fonctionnalisation par des aptamères du système microfluidique de tri en taille DLD pour implémenter la fonction tri biomarqueur-spécifique dans le dispositif en vue de l'isolement spécifique d'EVs. Dans ce cadre, la mise en œuvre d'une nouvelle méthodologie pour l'isolement spécifique d'EVs par un système microfluidique basé sur le principe de DLD sera réalisée dans le **chapitre 4**.

Résumé – Validation des sondes aptamères pour la capture d'EVs

- Les aptamères sont des sondes oligonucléotidiques se liant spécifiquement à une cible d'intérêt. Ces derniers permettent notamment une capture d'objets biologiques comme les EVs. Leur nature de brins d'ADN leur confère une propriété intéressante de relargage contrôlé par passage de l'état conformationnel d'aptamère à l'état ADN double brin.

- Quelques applications d'*aptasensors* (biocapteurs à base d'aptamères) rapportant la détection d'EVs par des méthodes électrochimiques et optiques ont été décrites. Le choix des sondes aptamères utilisées a été expliqué.

- Le développement d'un test ELASA (*Enzyme-Linked AptaSorbent Assay*) a été réalisé afin de permettre la validation des sondes aptamères (CD63-1, CD63-2 et EpCAM) pour la capture d'EVs issues de cellules cancéreuses, en remplacement des anticorps.

- Une évaluation de l'intégrité biochimique des EVs dans le temps, basée sur le test ELASA développé, a été mise en œuvre et montre une dégradation rapide des protéines membranaires d'intérêt. Finalement, la limite de détection des EVs cancéreux dans un milieu biologique complexe comme le plasma par capture à base d'aptamères a été décrite par le test ELASA et montre que cette méthode permet de détecter des quantités d'EVs similaires aux quantités contenues dans un échantillon de sang.

Chapitre 4 : Mise au point d'une méthode de tri microfluidique en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires supportées par des billes micrométriques

Chapitre 4 – Méthode de tri microfluidique DLD micro-ciblé biomarqueur-spécifique pour l'analyse d'EVs

- L'intérêt de l'association du tri en taille par le principe de DLD combiné à un tri biomarqueur-spécifique des EVs afin d'isoler des EVs marqueurs de pathologies à partir d'une biopsie liquide sera présenté. Le système DLD micro-ciblé sera développé pour le tri d'objets micrométriques depuis la conception et la fabrication de la puce silicum, et la mise au point de l'interface fluidique *via* la carte fluidique jusqu'au banc expérimental DLD permettant la mise en place de cette méthode sur des échantillons sanguins.

- L'implémentation de la fonction de tri biomarqueur-spécifique sera réalisée *via* la fonctionnalisation de billes micrométriques par des aptamères. Une méthode de capture des EVs d'intérêt sera mise en œuvre *via* ces billes fonctionnalisées et couplée au tri en taille par le système DLD. Différents aptamères ciblant les protéines membranaires CD63 et EpCAM seront envisagés pour la capture d'EVs spécifiques dans un échantillon biologique complexe.

- Finalement, le relargage contrôlé de sous-populations d'EVs sera envisagé par déplacement de l'équilibre d'affinité par ajout de brin complémentaire à l'aptamère. Le profil de taille de ces sous-populations et une relation entre expression protéique et taille des EVs pourront être établis.

Dans ce chapitre, un système DLD sera conçu pour le tri d'objets micrométriques en s'appuyant sur l'expertise détenue par le CEA Leti par de travaux précédents. La fabrication des composants DLD ainsi que leur intégration fluidique seront rapportées. La validation du diamètre critique du système DLD micro-ciblé sera vérifié à l'aide de particules micrométriques fluorescentes. Finalement, le développement d'une méthode de tri microfluidique couplée aux aptamères pour l'isolement spécifique d'EVs sera réalisé. Les limites de la méthode en termes de capacité de capture et de relargage seront étudiées.

1. Association de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires

Le **chapitre 1** a démontré l'intérêt de coupler un tri en taille d'EVs avec un tri par affinité à des fins diagnostiques. En effet, les protéines membranaires des EVs sont des biomarqueurs d'intérêt. Une connaissance plus approfondie de la distribution en taille des EVs en fonction de l'expression de ces biomarqueurs est un élément majeur à investiguer. Deux voies d'association tri en taille et biomarqueur-spécifique ont été envisagées dans ce projet de thèse. La première, décrite dans ce chapitre, consiste en l'utilisation d'un système microfluidique DLD existant et est intéressante par rapport à sa mise en œuvre aisée. Historiquement, ces dispositifs DLD disponibles au CEA Leti sont dédiés à des échantillons de taille micrométrique. Par ailleurs, leurs débits sont suffisamment élevés pour accéder à une analyse rapide et simple. Le développement d'une méthode de tri micrométrique couplée au tri biomarqueur-spécifique des aptamères peut être une solution technologique relativement simple d'utilisation réalisable à l'aide de micro-billes fonctionnalisées. Par contre, ce système ne permet d'extraire au mieux que deux sous-populations d'EVs correpondant à deux tailles de billes, l'une supérieure au D_c, l'autre inférieure au D_c. Les objets biologiques nanométriques, tels que les EVs, ne peuvent pas être résolus à travers ce type de système. Pour cela, une seconde approche, décrite dans les **chapitres 5 et 6**, passe par le développement d'un système microfluidique adapté à la gamme de taille nanométrique des EVs mais nécessitant un développement technologique microfluidique d'ampleur. Les débits sont faibles induisant des temps d'analyse plus élevé ainsi qu'un risque de bouchage accru. L'intérêt réside néanmoins dans la possibilité d'isoler un plus grand nombre de sous-populations d'EVs qu'avec la première approche, compte tenu du fait que le tri biomarqueur-spécifique se fait directement dans le canal *via* la fonctionnalisation aptamères de ce dernier, potentiellement localisée et multiple (**chapitre 6**). Dans ce chapitre, la validation du principe est réalisée par la première approche plus simple à mettre en œuvre.

En amont du tri microfluidique DLD, l'échantillon d'EVs peut être incubé avec des billes micrométriques fonctionnalisées par des aptamères ciblant les biomarqueurs d'intérêt. Ainsi, les EVs portant ces biomarqueurs peuvent être capturées à la surface des billes et sont désormais virtuellement identifiables. L'objectif est que le complexe billes-aptamères-EVs soit de taille supérieure au diamètre critique (D_c) du système DLD micro-ciblé et puisse ainsi être séparé de la population d'EVs ne portant pas ces biomarqueurs d'intérêt. Le principe est schématisé sur la figure ci-dessous (*Figure 4.1*). Une fois les EVs séparées, les profils de taille des sous-populations seront analysés. Ce système, bien que faisant appel à l'utilisation des billes micrométriques comme pourrait le faire un système de capture magnétique, est intéressant à développer pour l'isolement spécifique d'EVs. Non seulement, une capture magnétique ne permet de collecter qu'une seule sous-populations (*versus* deux ici), mais à ce jour, la stratégie d'isolement d'EVs par DLD couplée à l'utilisation d'aptamères n'a encore jamais été rapportée.

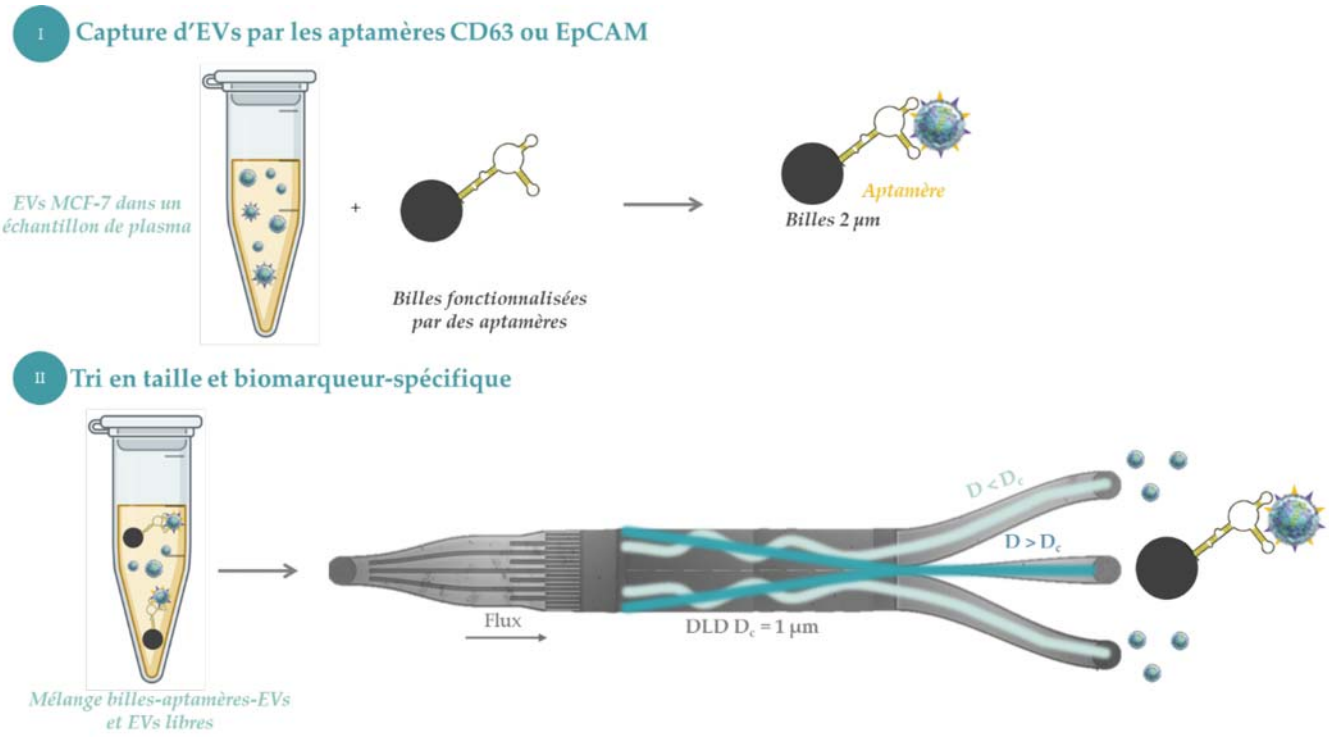


Figure 4.1 : Schéma de principe de tri microfluidique DLD micro-ciblé combiné à la capture d'EVs par des aptamères CD63 ou EpCAM supportés par des billes micrométriques. L'étape 1 correspond à la capture spécifique des EVs par les billes fonctionnalisées par des aptamères CD63 ou EpCAM. L'étape 2 permet le tri en taille et biomarqueur-spécifique des EVs d'intérêt ($CD63^+$ ou $EpCAM^+$).

2. Mise au point d'un système DLD micro-ciblé

Comme décrit dans le **chapitre 1**, les dispositifs DLD sont des composants permettant le tri en taille, fabriqués dans des substrats silicium à partir de microtechnologies. Différents types de *designs* DLD ont été rapportés ces dernières années[341] et depuis 2015, le CEA Leti a développé un savoir-faire dans le *design* de composants DLD en silicium[307,389]. Jusqu'à ce jour, les recherches autour de ces dispositifs de tri en taille se sont concentrées sur des objets biologiques cellulaires micrométriques (DLD micro-ciblé) au CEA Leti.

2.a. *Design* des composants DLD en silicium

Les composants silicium DLD développés et utilisés dans ce projet de thèse ont été conçus sur le format DLD symétrisé. Avec deux réseaux de piliers désorientés symétrisés par rapport à un mur central le long duquel les particules de taille supérieure au D_c sont déviées (*Figure 4.2*). La conception de ce module a été inspirée d'une publication de Loutherback *et al.*[315]. L'intérêt de ce *design* est à la fois d'augmenter le débit et surtout de recueillir les particules de taille supérieure au D_c dans un volume restreint par effet de concentration pour en faciliter l'analyse.

Figure 4.2 : Tri en taille basé sur le principe de DLD appliqué à un composant DLD symétrisé (génération DLD3 non-étudiée dans cette thèse). Les particules de taille supérieure au D_c suivent la désorientation du réseau et sont progressivement déviées et concentrées au niveau du muret central. Les particules de taille inférieure au D_c adoptent une trajectoire en zigzag.

Comme illustré sur la *Figure 4.3*, il comporte une seule entrée et trois sorties : une sortie centrale permet de collecter les objets dont la taille est supérieure au D_c et deux sorties latérales collectant les particules non-déviées, de taille inférieure au D_c, dans chacun des deux réseaux DLD. Des sous-canaux ont été insérés entre l'entrée et le réseau de piliers d'une part et entre le réseau de piliers et les sorties d'autre part afin de limiter le colmatage de la DLD et de conserver une résistance hydraulique constante malgré la taille variable des canaux de sortie.

Il est important de garder à l'esprit que dans un système DLD symétrisé, la sortie déviée correspond à la sortie centrale tandis que les particules non-déviées sont collectées dans les sorties latérales (*Figure 4.3*).

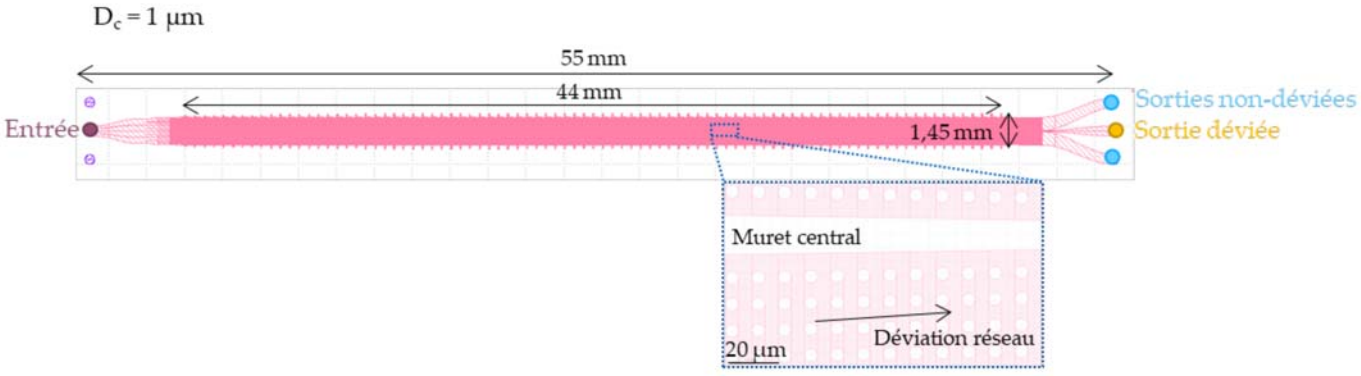


Figure 4.3 : Disposition du canal DLD micro-ciblé.

Ce système DLD a été conçu avec un diamètre de piliers et un espacement entre les piliers de 5 µm, une désorientation du réseau de piliers permettant de viser un D_c d'environ 1 µm. La largeur de la sortie centrale étant 55 µm *versus* la largeur totale de 1,45 mm, l'échantillon dévié est recueilli dans un volume

quatre fois plus petit et ainsi concentré d'un facteur 25 environ par rapport à l'échantillon brut injecté. Les dimensions caractéristiques du canal DLD $D_c = 1$ µm sont résumées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 4.1*).

DLD D_c = 1 µm	
Diamètre des piliers (D_P)	5 µm
Espace interpiliers (G)	5 µm
Nombre de période (N)	87
Profondeur du canal (H)	57 µm
Longueur du réseau DLD (L)	44 mm
Largeur du réseau DLD (W)	1,45 mm
Longueur totale de la puce	55 mm
Aspect ratio (AR) des piliers	11

Tableau 4.1 : Dimensions caractéristiques du canal DLD D_c = 1 µm.

Il convient de vérifier que les hypothèses posées par le tri par DLD sont validées pour cette géométrie. La première hypothèse réside dans le fait que le flux doit avoir un écoulement laminaire dans le réseau de piliers. En effet, l'écoulement d'un fluide peut être de trois natures différentes. Le régime de Stockes, décrit comme un régime où les forces d'inertie liées aux vitesses sont négligeables et les forces de viscosité et de pression s'équilibrent, est un phénomène classique dans les systèmes microfluidiques. Quand les forces d'inertie rentrent en jeu, alors le régime devient laminaire et les lignes de courant sont bien identifiables. C'est le régime que l'on recherche dans les systèmes DLD. Enfin, à partir d'une certaine force d'inertie, des instabilités perturbent les lignes de courant, c'est l'établissement de la turbulence. L'écoulement d'un fluide est qualifié par le nombre de Reynolds (*Équation 4.1*), il est inférieur à 1 quand cet écoulement est laminaire et supérieur à 1 quand l'écoulement est turbulent.

Équation 4.1 : Calcul du nombre de Reynolds caractéristique de l'écoulement d'un fluide dans un système.

Afin de calculer le R_e du système DLD $D_c = 1$ µm, la vitesse du fluide dans le canal DLD et la viscosité cinématiques sont des paramètres préliminaires à calculer.

Dans un premier temps, la viscosité hydrodynamique du fluide porteur est calculée. Les fluides utilisés sont à base de tampon aqueux (PBS ou milieu de culture notamment). Afin de confirmer que la viscosité hydrodynamique des tampons est assimilable à celle de l'eau ($\mu_{eau} = 1 \times 10^{-3}\ Pa.s$), une vérification expérimentale est effectuée à l'aide d'un rhéomètre (Kinesus, **Malvern Panalytical**). Les données sont présentées sur la *Figure 4.4*.

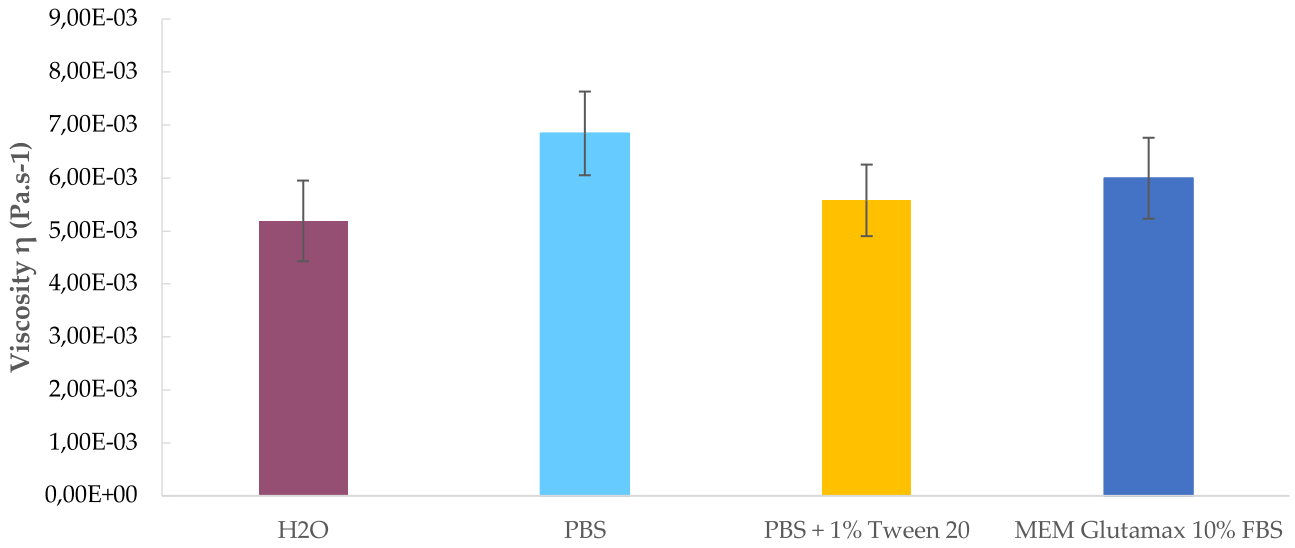


Figure 4.4 : Viscosité hydrodynamique expérimentale de différents fluides aqueux : l'eau, le PBS, le PBS 1% Tween 20, le MEM Glutamanax 10% FBS.

Après vérifications par test statistique de Student (α = 5%), les moyennes de viscosité hydrodynamique expérimentales obtenues ne sont pas significativement différentes de celle de l'eau. Ainsi, elles peuvent être approximées par la viscosité théorique de l'eau.

Dans un second temps, la vitesse des particules dans le canal DLD est calculée selon une équation extraite dans le manuscrit de thèse de Davis de l'Université de Princeton en 2008[304] (*Équation 4.2*).

Équation 4.2 : Vitesse des particules dans le canal DLD (m/s), d'après Davis[304].

La pression à la sortie du canal DLD D_c = 1 µm est associée à la pression atmosphérique. Les particules ont une vitesse de 5,6x10^{-3} m/s. Une fois ces paramètres déterminés, le calcul du R_e est effectué. Pour rappel, le nombre de Reynolds traduit le régime d'écoulement du fluide. Dans ce cas, il est largement inférieur à 1 (2,79x10^{-2}), l'écoulement du fluide est en régime laminaire et la turbulence ne vient pas modifier les lignes de flux régissant le tri en taille par le principe DLD. La première hypothèse est ainsi vérifiée.

La seconde hypothèse repose sur l'advection des particules dans le fluide. Pour rappel, l'advection est le transport d'un élément donné par le mouvement du milieu environnant. En effet, les particules dans le réseau DLD doivent être soumises majoritairement à l'advection du flux et la diffusion de celles-ci n'est pas souhaitable afin d'obtenir un tri en taille efficace. Pour cela, le calcul du nombre de Peclet mesurant l'advection *versus* la diffusion est pertinent (*Équation 4.3*).

Équation 4.3 : Calcul du nombre de Peclet comparant l'advection à la diffusion d'un fluide dans un système.

Secondairement, la diffusivité des particules est calculée en fixant à 500 nm le rayon des particules (particules de diamètre 1 µm, particules les plus petites), elle est égale à $4{,}37 \times 10^{-13}$ m^2/s à 25°C (*Équation 4.4*).

Équation 4.4 : Diffusivité des particules dans un fluide (m^2/s).

Les différentes composantes du nombre de Peclet déterminées, le P_e du système DLD D_c = 1 µm correspond à $1{,}28 \times 10^4$. Pour rappel, il reflète l'advection *versus* la diffusion des particules dans le canal DLD. Si ce nombre sans dimension est supérieur à 1 alors le phénomène de diffusion agit de façon bien plus faible que le transport hydrodynamique. *A contrario*, si ce nombre est inférieur à 1 alors la diffusion est le phénomène majoritaire. Le calcul du P_e effectué permet d'affirmer que l'advection est majoritaire et que la diffusion des particules est un phénomène mineur dans le réseau de piliers et le tri en taille pourra être mené à bien dans le système DLD avec la géométrie choisie.

Suite à cela, il convient d'établir le débit théorique du fluide dans le canal DLD D_c = 1 µm. Le calcul du débit fait appel à la résistivité hydraulique liée au réseau DLD. Pour résoudre le débit fluidique, la résistivité hydraulique est calculée selon l'*Équation 4.5*.

Équation 4.5 : Résistivité hydraulique calculée dans un canal DLD ($Pa.s/m^3$).

Finalement, ce débit théorique est calculé dans le canal DLD à l'aide de l'*Équation 4.6*.

Équation 4.6 : Débit dans le canal DLD (µL/min).

La résistivité hydraulique du canal DLD D_c = 1 µm est de $5{,}37 \times 10^{14}$ $Pa.s/m^3$. De plus, le débit associé à 800 mbars de pression d'injection de l'échantillon est 17,9 µL/min soit 1 074 µL/h.

2.b. Fabrication en salle blanche des composants DLD et intégration fluidique

Dans la littérature, les composants DLD sont souvent réalisés en polydiméthylsiloxane (PDMS) par moulage dans un moule silicium et la taille caractéristique est de l'ordre de plusieurs µm voir dizaines de µm. Ici, nous disposons de technologies silicium permettant de réaliser des motifs plus fins, donc de D_c plus petits, tout en adoptant un compromis entre l'établissement d'un D_c nanométrique et une résistance hydraulique acceptable. L'intérêt des facteurs de forme élevés est de pouvoir augmenter le volume et ainsi le débit d'échantillon traité pour un D_c donné.

La fabrication des modules DLD a été réalisée sur des *wafers* de 200 mm de silicium dans les salles blanches de microélectronique du CEA Leti. La technologie silicium permet de fabriquer des composants micrométriques, ainsi que des structures à haut facteur de forme, avec reproductibilité. Ceci est particulièrement intéressant, et notamment pour les plus petits dispositifs DLD, où les facteurs de forme (*aspect ratio*) des piliers peuvent être fabriqués de manière fiable jusqu'à une valeur de vingt, permettant ainsi l'optimisation du débit d'échantillon avec des canaux profonds.

Brièvement, le processus consiste d'abord en la préparation d'un masque dur afin de permettre la gravure profonde des piliers dans le substrat de silicium (oxydation thermique, couplée à un dépôt d'oxyde). Le canal DLD (avec les piliers) est dessiné en utilisant la lithographie UV profonde (λ = 244 nm). Le masque dur est gravé à sec avant de graver à sec les piliers dans le substrat de silicium (Si). Des étapes de nettoyage ultérieures (bains chimiques et cycles d'oxydation/désoxydation pour les substrats de Si) sont effectuées. Les *wafers* de silicium subissent en outre une oxydation thermique (100 nm SiO_2), de manière à lisser le canal DLD (piliers et parois du canal) et à rendre la surface hydrophile. Les substrats en verre et les *wafers* de silicium sont ensuite scellés par un procédé de collage anodique (400°C). Une dernière étape de photolithographie et de gravure est ensuite réalisée sur la face arrière de l'assemblage, afin de structurer les entrées/sorties fluidiques du module DLD. Les substrats assemblés sont ensuite découpés en puces. Ce procédé de fabrication est résumé sur la *Figure 4.5* mais comporte au total plus de 35 étapes de fabrication. Le déroulement du processus menant à la fabrication des modules DLD est plus amplement détaillé en annexe.

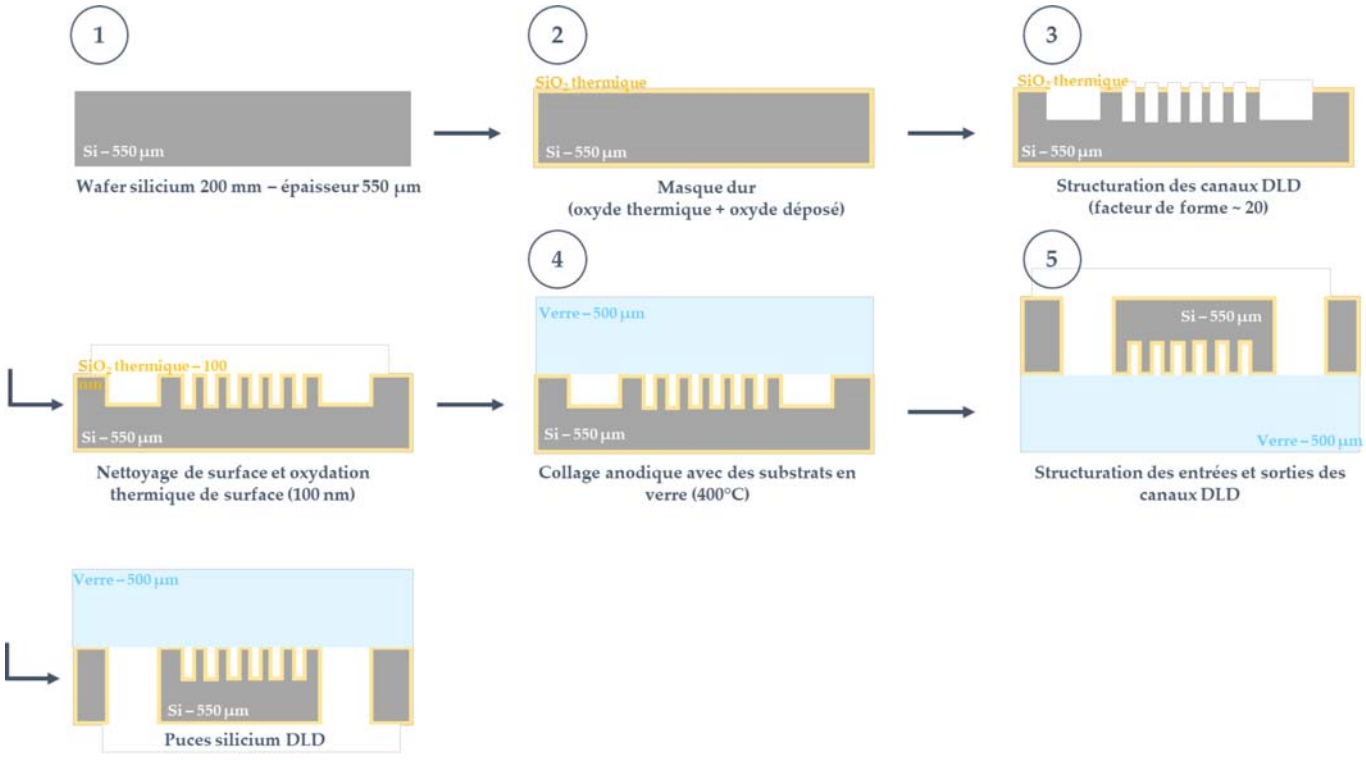


Figure 4.5 : Étapes principales de fabrication des composants silicium DLD.

À la fin de la fabrication en salle blanche, les composants DLD sont sortis de la plateforme technologique et stockés au laboratoire à température ambiante. La *Figure 4.6* représente un *wafer* de 200 mm avec les composants DLD et les images associées de la puce DLD D_c = 1 µm.

Figure 4.6 : Dispositifs DLD micro-ciblés ; a) Wafers de composants DLD ; b) DLD D_c = 1 µm à une entrée et trois sorties ; c) Vue MEB du dessus du réseau DLD symétrisé et du muret central ; d) Vue MEB d'un pilier du réseau DLD (diamètre 5 µm) en sortie de gravure (présence du masque dur en haut du pilier).

Un échantillon liquide ne peut pas être directement traité dans les composants DLD. Ces derniers nécessitent une intégration fluidique comme interface. Cette carte fluidique permettant l'intégration des modules DLD utilisés est illustrée à la *Figure 4.7*. La taille de la carte est équivalente au format d'une carte de crédit, elle est fabriquée en Copolymère d'Oléfine Cyclique (COC) et est usinée à l'aide d'une fraise avec une précision micrométrique. Le COC est un polymère biocompatible facilement scellable. En effet, la carte fluidique COC des systèmes DLD est composée de deux cartes COC primaires scellées à haute température (100°C) ne nécessitant pas l'usage de colle.

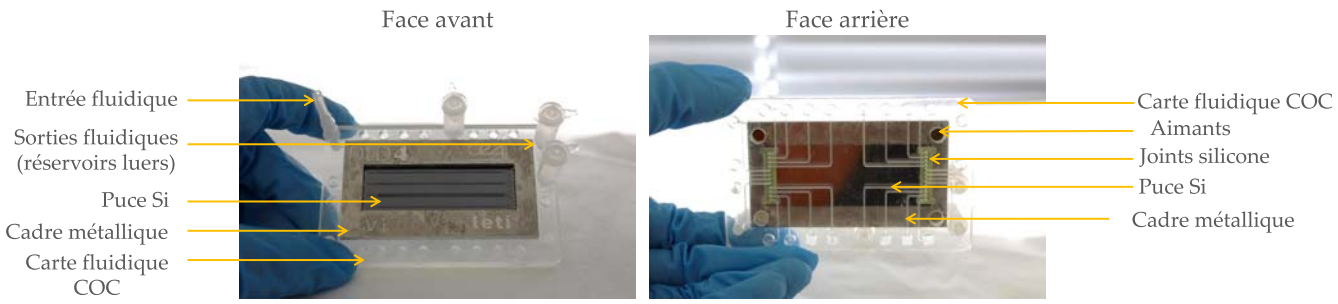


Figure 4.7 : Carte fluidique associée au composant DLD micro-ciblé.

La puce DLD est maintenue à l'aide d'un cadre aimanté en aluminium et ce système permet simultanément :

- La connexion fluidique des modules DLD à l'environnement extérieur (échantillon acheminé et collecté) *via* des contrôleurs de pression ;
- Le retrait et le remplacement aisé des composants DLD, permettant en parallèle la réutilisation de la cartouche fluidique ;
- Un bon alignement entre les composants DLD et la cartouche (de l'ordre de 50 µm) ;
- Une bonne étanchéité entre ces éléments, grâce à l'ajout de joints en silicone jusqu'à 1,5 bars de pression d'injection.

Ce packaging a été utilisé pour le test et la caractérisation de tous les modules DLD micro-ciblés développés ultérieurement.

2.c. Banc expérimental DLD micro-ciblé

Une fois la puce DLD montée dans la carte fluidique dédiée, le fluide d'intérêt est injecté en utilisant un contrôleur en pression (MCFS-FLEX, **Fluigent**). Le système de DLD micro-ciblé est utilisé à une pression de travail de 800 mbars à un débit d'environ 1 100 µL/h. Un microscope optique couplé à une source UV et équipé de cubes-filtres pour la fluorescence et d'une caméra (CCD) permet l'observation de l'écoulement fluidique dans le canal DLD et l'enregistrement des trajectoires des billes fluorescentes. L'échantillon traité est collecté dans les sorties fluidiques constituées de réservoirs lueurs connectés directement à la carte plastique. Le dispositif expérimental complet est présenté sur la *Figure 4.8*.

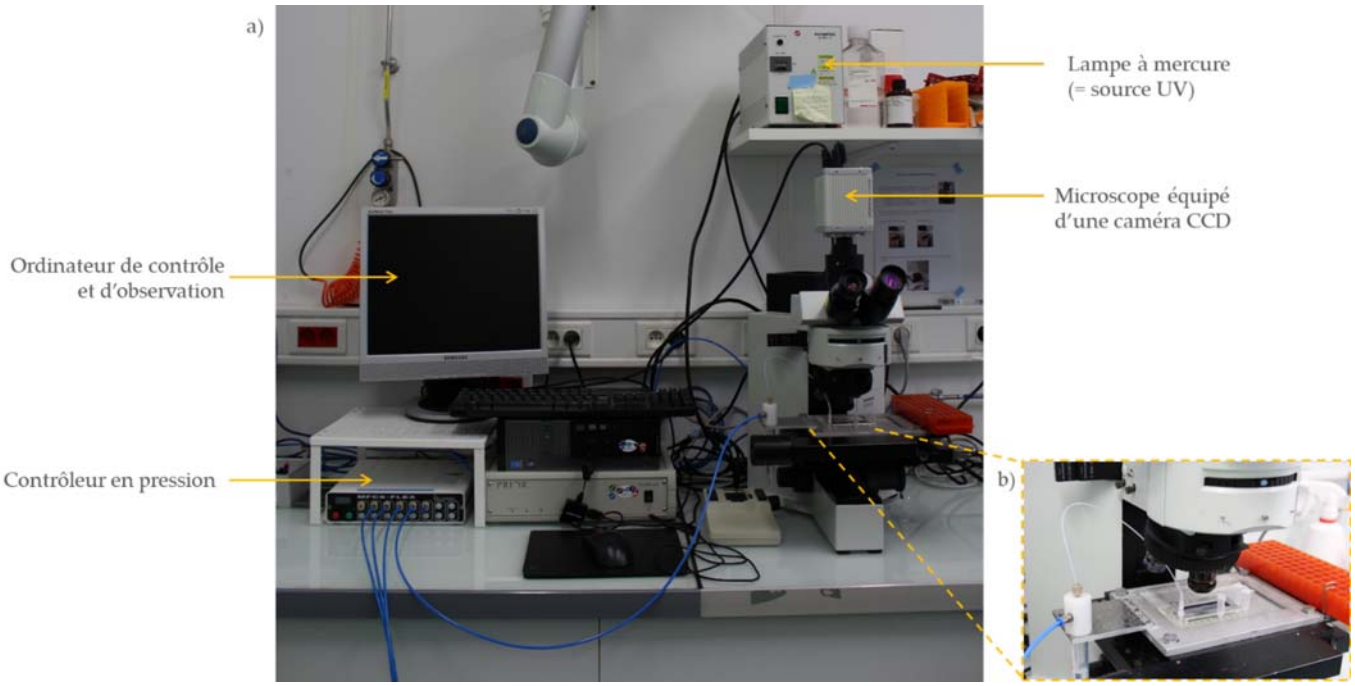


Figure 4.8 : a) Banc expérimental utilisé pour la caractérisation des composants DLD, montrant le microscope à fluorescence, ainsi que le contrôleur basé en pression ; b) Vue rapprochée de la carte fluidique sous l'objectif du microscope.

3. Validation du tri en taille du système DLD pour des particules micrométriques

Le D_c du systeme DLD micro-ciblé est déterminé expérimentalement par la déviation de différentes tailles de billes. Ce système a été conçu afin d'avoir un D_c théorique d'environ 1 µm. Afin de valider cela, un mélange de deux tailles de billes de polystyrène fluorescentes (Red et Green Fluoromax®) de 1 et 2 µm est injecté dans le composant DLD D_c = 1 µm à une concentration totale de 10^9 billes/mL. Ce mélange est réalisé dans du PBS 1% Tween 20 (afin d'éviter l'aggrégation des billes de polystyrène). La fluorescence des particules est suivie tout au long du canal DLD. Trois emplacements (entrée ; centre ; sorties) sont notamment représentés sur la *Figure 4.9*. La déviation des plus grosses particules (2 µm) au centre du réseau de piliers jusqu'à la sortie centrale (déviée) est clairement mise en évidence (*Figure 4.9b*).

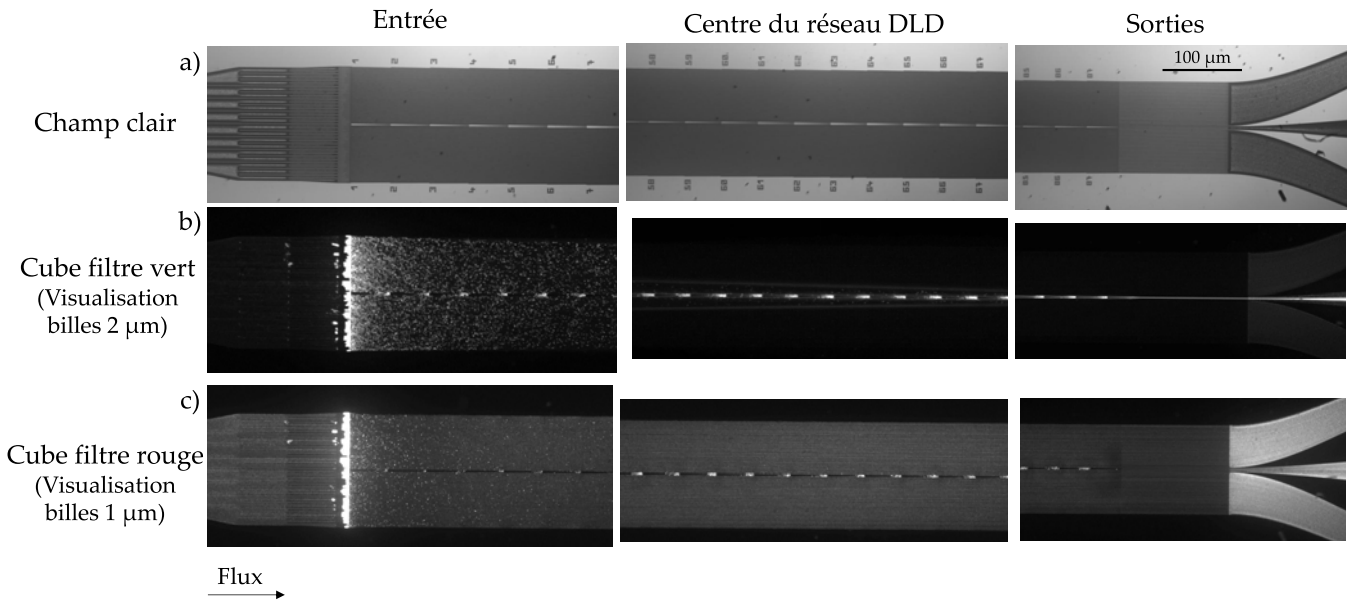


Figure 4.9 : Images de microscopie optique du réseau DLD micro-ciblé obtenu après injection d'un mélange de billes fluorescentes de 1 et 2 µm, a) Image en champ clair du réseau DLD, b) Image de fluorescence obtenue avec le cube filtre vert correspondant aux billes 2 µm déviées le long du réseau DLD, c) Image de fluorescence obtenue avec le cube filtre rouge correspondant aux billes 1 µm non déviées dans le réseau DLD.

En effet, à l'injection, la fluorescence est collectée sur toute la longueur du canal DLD, quelle que soit la taille des billes. Au centre du réseau DLD, la concentration à proximité du muret central pour les billes de 2 µm (déviées) est visible tandis que la fluorescence des billes 1 µm (non-déviées) est collectée sur toute la largeur du canal. Finalement, en sortie, les billes de 2 µm sont uniquement collectées dans la sortie centrale tandis que les billes de 1 µm sont collectées dans toutes les sorties. Une analyse des niveaux de gris des images de fluorescence des sorties est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ confirmant la déviation des billes de 2 µm (*Figure 4.10*), tandis que les petites particules (1 µm) sont collectées dans toutes les sorties.

Figure 4.10 : Profil d'intensité de fluorescence des sorties du réseau DLD D_c = 1 µm.

Afin d'évaluer la précision de tri de ce dispositif, la fluorescence du mélange de billes (fluorescence rouge et verte) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (Infinite® M1000, **TECAN**). Les niveaux d'intensité de fluorescence sont montrés sur la *Figure 4.11*. La fluorescence correspondant aux billes de 2 µm est collectée uniquement dans la sortie déviée alors que la fluorescence des billes de 1 µm est collectée dans toutes les sorties. De plus, l'effet de concentration de la sortie déviée est observé entre les intensités de fluorescence de l'entrée *versus* la sortie déviée.

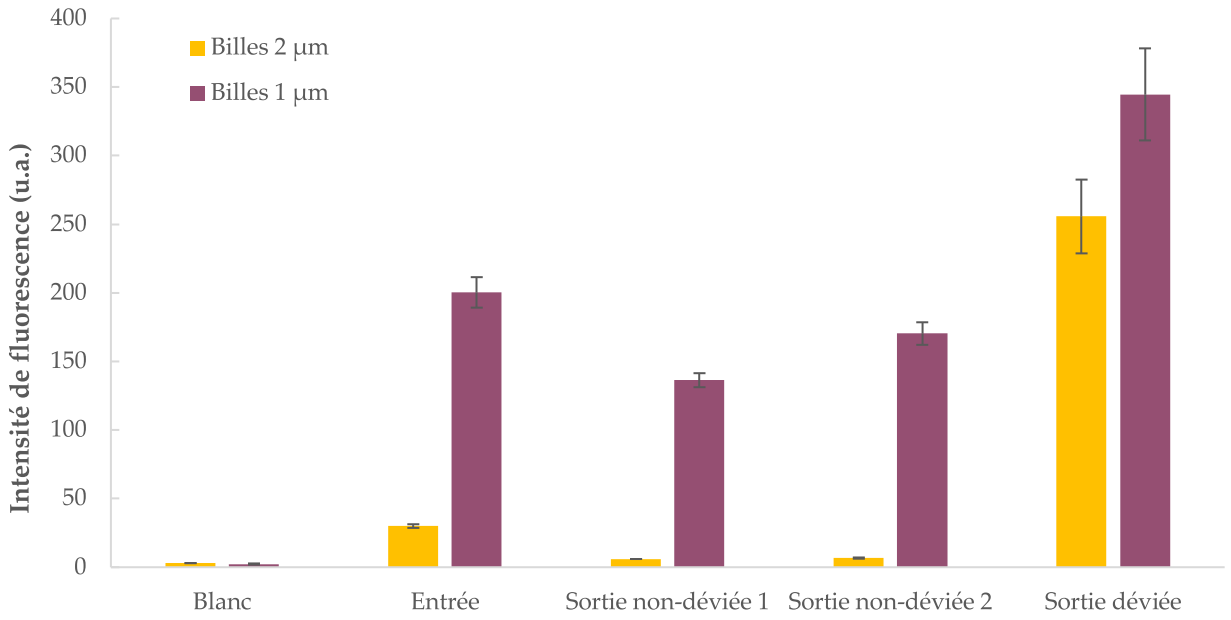


Figure 4.11 : Tri en taille d'un mélange de billes de 1 et 2 µm par le système DLD D_c = 1 µm. Intensités de fluorescence du mélange de billes (1 et 2 µm) mesurées aux différentes longueurs d'onde d'intérêt à l'entrée et dans les différentes sorties du système DLD micro-ciblé. Le blanc correspond à la fluorescence du tampon de dilution (PBS 1% Tween 20). Chaque condition représente un total de deux valeurs.

Cet exemple illustre l'efficacité de tri atteint avec le système DLD micro-ciblé et permet de valider expérimentalement le D_c = 1 µm.

4. Fonctionnalisation de billes micrométriques par des sondes aptamères

En vue de la capture supportée de vésicules extracellulaires, la fonctionnalisation de billes par les aptamères d'intérêt a été réalisée. Pour rappel, cette partie a pour objectif le tri biomarqueur-spécifique des EVs capturées sur des billes par les aptamères d'intérêt *versus* des EVs sans biomarqueurs d'intérêt *a priori*. Cela revient donc à résoudre un échantillon ayant d'un côté des billes (quelques µm) couplées aux EVs et de l'autre des EVs (50-300 nm). La taille des billes choisie sera de 2 µm afin de permettre une déviation des billes portant les EVs d'intérêt dans le système DLD micro-ciblé.

4.a. Greffage de séquences aptamères sur les billes micrométriques

La fonctionnalisation des aptamères sur des billes de polystyrène peut se faire simplement par l'utilisation du couplage biotine-streptavidine. En effet, des billes de polystyrène de diamètre 2 µm fonctionnalisées par de la streptavidine sont disponibles commercialement (**Polysciences Europe GmbH**). De l'autre côté, les aptamères CD63 et EpCAM ont été modifiés avec l'ajout d'une fonction biotine en 5′ de la séquence d'ADN.

La fonctionnalisation des billes par les aptamères a ainsi été réalisé dans une solution de billes à 5 mg/mL incubée avec une solution d'aptamère à 2 µM dans le tampon PBS, à température ambiante, sous agitation durant 10 minutes. L'excès d'aptamères a été retiré par trois lavage des billes après centrifugation à 2 000 g avec du tampon de lavage (PBS + 400 mM NaCl + 0,05% Tween 20). Les billes ont été saturées avec une solution tamponée de PBS 5% BSA durant 30 minutes et les étapes de lavages précédentes ont à nouveau été effectuées. La fonctionnalisation des aptamères sur les billes a été vérifiée en les hybridant avec leurs séquences complémentaires, modifiées par ajout d'un fluorophore de type fluorescéine (FAM : $\lambda_{excitation}$ = 494 nm ; $\lambda_{émission}$ = 521 nm). Cette étape d'hybridation a été réalisée par ajout des séquences complémentaires à 0,5 µM diluées dans le tampon d'hybridation (PBS + 400 mM NaCl + 0,05% Tween 20 ; Solution de Denhard 0,01X ; ADN sperme de saumon 3 µg/mL) durant 10 minutes, à 55°C. L'excédent de cibles complémentaires est retiré par trois lavages avec le tampon de rinçage. La fluorescence a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (Infinite® M1000, **TECAN**).

Les trois aptamères d'intérêt (CD63-1, CD63-2 et EpCAM) ont été greffés sur les billes de 2 µm. Un lot de billes avec un oligonucléotide modèle (Zip9) a été ajouté et est considéré comme le contrôle négatif. Les trois lots de billes fonctionnalisées avec respectivement CD63-1, CD63-2 et EpCAM ont ensuite été hybridés avec les complémentaires-FAM correspondants des aptamères. Le contrôle Zip9 a été hybridé avec la séquence complémentaire à l'aptamère CD63-1.

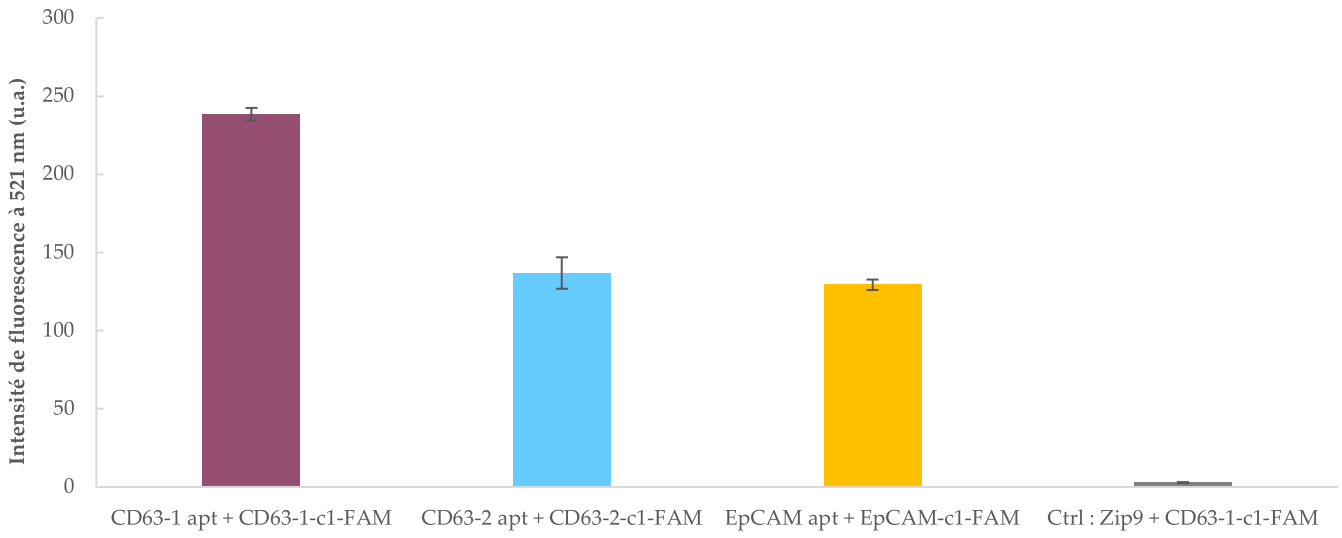


Figure 4.12 : Fluorescence relative à l'hybridation des séquences complémentaires des aptamères CD63 et EpCAM préalablement greffés sur des billes de polystyrène de 2 µm.

Les résultats d'intensité de fluorescence recueillis montrent, sur la *Figure 4.12*, l'hybridation effective des aptamères d'intérêt par leurs séquences complémentaires et ainsi, indirectement, la fonctionnalisation des billes par les séquences d'aptamères. L'intensité de fluorescence des billes fonctionnalisées par la séquence Zip9 est très faible permettant de conclure à la spécificité des séquences complémentaires pour leurs sondes et à l'absence de signal non-spécifique.

4.b. Anticipation du relargage des vésicules extracellulaires par le déplacement de brins d'oligonucléotides ADN

L'aptamère en tant que sonde de capture dispose d'une certaine conformation tridimensionnelle comme rapporté dans le **chapitre 3**. Considérant sa nature de séquence oligonucléotidique ADN, l'aptamère est aussi capable d'adopter une conformation classique d'ADN double brin en présence de sa séquence complémentaire.

Tout d'abord, quelques rappels fondamentaux sur les réactions d'hybridations de brins d'ADN sont nécessaires pour mieux appréhender la stratégie de relargage appliquée par la suite. L'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires est une réaction énergétiquement favorable car elle implique la stabilisation de ces deux brins sous forme de double hélice d'ADN. L'hybridation et la dissociation de ces deux brins sont régis par la valeur de la constante d'équilibre : $K = \frac{k_{hybridation}}{k_{dissociation}}$. Elle est elle-même reliée à la variation d'énergie libre de Gibbs : $\Delta G^0 = -RT \ln K$. Ainsi, la constante d'hybridation sera d'autant élevée et ainsi l'hybridation favorisée que l'énergie libre sera faible. Dans le cadre de l'hybridation de deux brins complémentaires de tailles différentes à un même oligonucléotide, l'hybridation sera favorisée pour le brin complémentaire le plus long car le duplex formé aura une énergie libre de Gibbs plus faible que le duplex formé par le brin court.

Simmel *et al.* introduisent, dans leur revue sur les différents principes et les applications des déplacements de brins d'acides nucléiques[282], le terme de *toehold-mediated strand displacement reactions*. Ce type de réaction décrit les déplacements de brins d'affinité différente pour un même oligonucléotide. Ces réactions *toeholds* permettent d'augmenter le taux de déplacement des brins en augmentant la fréquence de migration des brins. Ce processus est illustré sur la *Figure 4.13*.

Figure 4.13 : Déplacement de brin médié par une réaction Toehold. Un brin court (C) est hybridé à l'oligonucléotide de choix (E), formant un duplex nommé S. Un second brin plus long (L), disposant d'un point d'ancrage supplémentaire, déplace le brin court pour former le duplex R. Les étapes intermédiaires impliquées dans le processus de déplacement de brins sont décrites.

Dans la réaction globale, le brin C, également appelé court, est déplacé de l'oligonucléotide E, formant initialement le duplex S par le brin L, brin long, pour accéder au duplex R. Le point d'ancrage est l'extension du brin L (jaune). La réaction de déplacement est initiée lorsque le domaine jaune du brin L s'hybride à la partie orange de l'oligonucléotide E. Cette hybridation permet d'initier la réaction à trois brins permettant le déplacement du brin C. Le brin C est progressivement déplacé permettant *in fine* la formation du duplex R par hybridation du brin L et de l'oligonucléotide E.

Par analogie, l'équilibre de la conformation tridimensionnelle d'un aptamère peut être déplacé par ajout de la séquence complémentaire correspondante. En effet, la forme hybridée en double hélice d'ADN est une conformation plus stable en termes d'énergie que la forme aptamère. Le déplacement de l'équilibre se fait en faveur de cette conformation : en effet, en présence de son brin complémentaire, l'aptamère se réorganise en double hélice d'ADN, ce qui rend possible le relargage des cibles par ces sondes aptamères.

Le concept de capture et relargage contrôlé est présenté sur la *Figure 4.14*. En effet, le relargage contrôlé des EVs par ajout d'un brin complémentaire permettant le changement de conformation aptamère – ADN double hélice repose sur le même mécanisme fondamental de stabilisation par minimisation d'énergie que le déplacement d'un brin complémentaire court au profit d'un brin complémentaire plus long sur l'aptamère, qui représente une forme d'hybridation plus stable (*Figure 4.14*). La stratégie de déplacement de brins longs des aptamères est mise en œuvre.

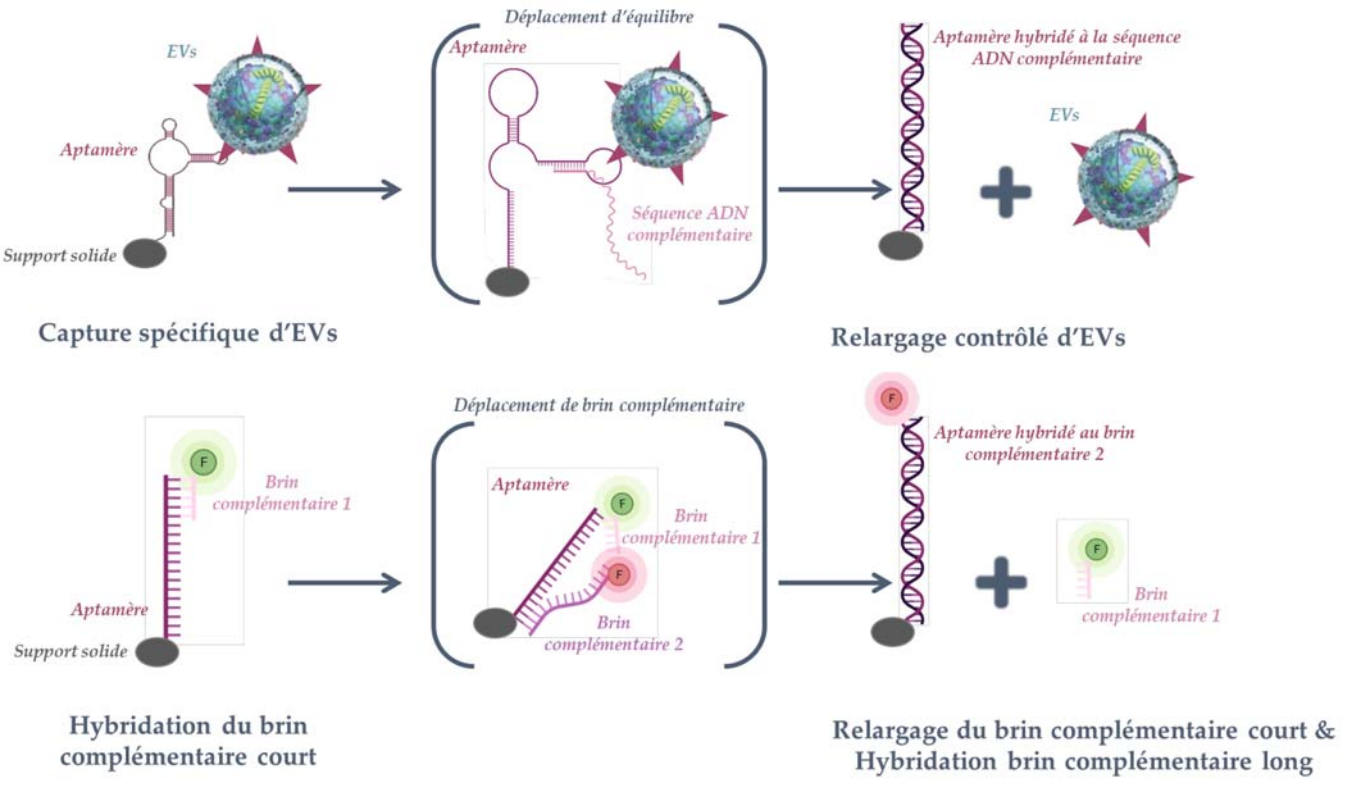


Figure 4.14 : Principe du relargage contrôlé d'EVs par les aptamères comparé au déplacement de brins complémentaires d'affinités différentes et suivi par lecture de fluorescence, notée F.

Pour cela, deux types de brins complémentaires de longueurs différentes ont été conçus afin de pouvoir relarguer les EVs d'intérêt. Ils s'hybrident du côté 3' libre de l'aptamère (les premiers brins complémentaires « courts » correspondent à ceux utilisés pour la validation du greffage des aptamères sur les billes, tels que décrits au paragraphe précédent). La température de fusion moléculaire d'un

fragment d'ADN (T_m) est choisie, la conception de longueur et de la séquence complémentaire est ensuite réalisée. Cette température est la température d'équilibre à laquelle 50 % des molécules sont sous forme double brin, traduisant ainsi l'état de dénaturation des brins d'ADN. Un ordre de grandeur des T_m des brins complémentaires a été fixé aux environs de 40-45°C pour les séquences complémentaires courtes (dénommées c1) et autour de 50-55°C pour les séquences longues (dénommées c2). Cela a permis une définition des séquences complémentaires (*Tableau 4.2*). De la même façon que pour les séquences d'aptamères une séquence polyT a été placée en 5' afin d'espacer la partie aptamère et les modifications chimiques possibles (ajout d'une molécule fluorescente pour le suivi d'hybridation notamment). Le tableau ci-dessous (*Tableau 4.2*) dresse le récapitulatif des séquences utilisées ainsi que leurs principales caractéristiques. Les brins courts (17 à 20 bases) sont modifiés par l'ajout d'un fluorophore FAM ($\lambda_{excitation}$ = 488 nm ; $\lambda_{émission}$ = 521 nm) tandis que les brins longs (24 à 28 bases) sont modifiés par un fluorophore Cy5 ($\lambda_{excitation}$ = 620 nm ; $\lambda_{émission}$ = 640 nm). Ces deux types de fluorophores ont des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission bien distinctes et disposent d'une très faible zone de recouvrement des longueurs d'ondes d'émission, considérée donc comme négligeable.

Aptamères	Séquences complémentaires	Séquences 5'-3'	Nombre de bases	T_m	Modifications
CD63-1	CD63-1-c1	TTT TTG CAT TAG TGT CAC GG	20	42°C	FAM en 5'
	CD63-1-c2	TTT TTG CAT TAG TGT CAC GGG AGC GA	26	52°C	Cy5 en 5'
CD63-2	CD63-2-c1	TTT TTC ACG CTG TCA GG	17	40°C	FAM en 5'
	CD63-2-c2	TTT TTC ACG CTG TCA GGG TTC GAC	24	50°C	Cy5 en 5'
EpCAM	EpCAM-c1	TTT TTA GGC CAA CCC CCC A	19	46°C	FAM en 5'
	EpCAM-c2	TTT TTA GGC CAA CCC CCC ATG ACA ACG T	28	55°C	Cy5 en 5'

Tableau 4.2 : Tableau récapitulatif des séquences complémentaires des aptamères utilisées et de leurs principales caractéristiques.

Seuls les brins courts marqués FAM ont effectivement été hybridés : la fluorescence a été observée uniquement à la longueur d'onde d'émission correspondante (521 nm). Les résultats sont présentés sur la *Figure 4.15b*. À la suite de cette première étape, les billes fonctionnalisées ont été resuspendues et les brins complémentaires longs marqués Cy5 sont ajoutés aux différentes solutions de billes et incubés à température ambiante durant 15 minutes sous agitation. Après une étape de lavage, la fluorescence a de nouveau été lue à 521 et 640 nm. Cette fois-ci, la fluorescence à 521 nm est très faible tandis qu'un signal de fluorescence à 640 nm est notable, bien que plus faible que le signal initial d'hybridation ; cette observation est valable pour les trois aptamères (*Figure 4.15c*). Ceci traduit le déplacement du brin court marqué FAM par l'hybridation du second brin long marqué Cy5 en raison de la plus grande affinité de l'aptamère pour un brin complémentaire plus long. La conformation en double hélice étant d'autant plus stabilisée que le brin oligonucléotide complémentaire est long. La différence d'intensité de fluorescence observée entre l'hybridation avec le brin court et celle du brin long pour les trois aptamères peut être

relative aux fluorophores respectifs des deux brins. En effet, les brins longs sont marqués Cy5 qui a une intensité de fluorescence plus faible que celle de Cy3.

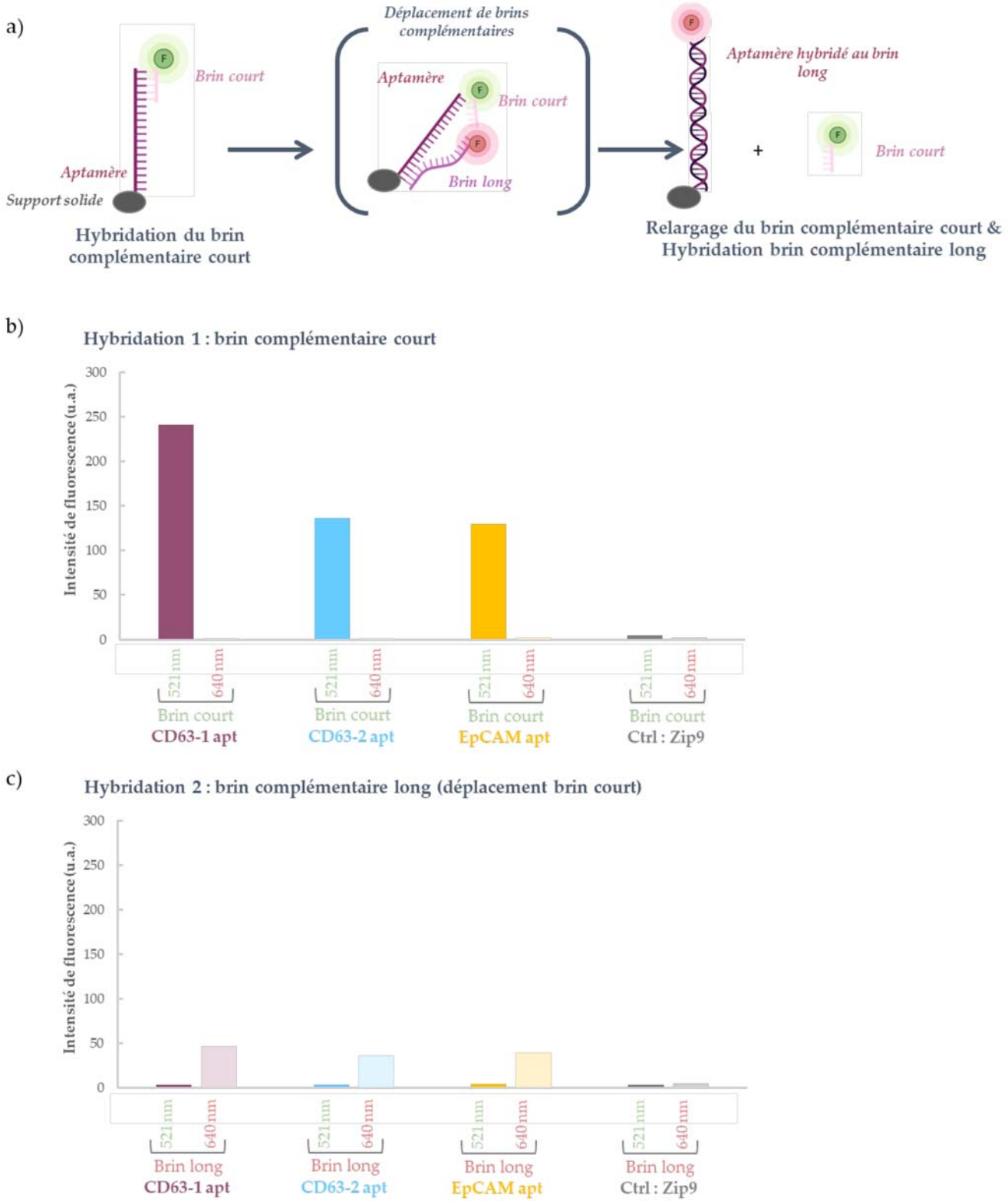


Figure 4.15 : a) Principe de déplacement de brins de longueurs différentes sur une séquence aptamère greffée sur un support solide. b) et c) Déplacements de brins complémentaires d'affinités différentes pour les aptamères CD63-1, CD63-2 et EpCAM supportés par des billes de polystyrène de 2 µm. Les intensités de fluorescence des fluorophores FAM et Cy5 sont mesurées respectivement à 521 et 640 nm. Le contrôle Zip9 permet de vérifier la spécificité des séquences complémentaires pour les séquences d'aptamères CD63 et EpCAM.

Le déplacement de brins complémentaires de différentes affinités le long d'une sonde aptamère à température ambiante est un résultat prometteur pour la stratégie de relargage contrôlé envisagée pour les EVs. Ce phénomène de déplacement de brins est réalisable en ajoutant entre six et neuf bases aux séquences complémentaires initiales (courtes) ; ceci suffit à augmenter la constante d'affinité de la cible pour la sonde de façon à déplacer le brin de plus faible affinité. De nombreuses applications de déplacements de brins d'oligonucléotides ont d'ailleurs été reportées récemment par Simmel *et al.*[282].

5. Capture supportée biomarqueur-spécifique de vésicules extracellulaires par le système DLD micro-ciblé

La fonctionnalisation des billes est désormais effective, la capture des EVs par les aptamères supportés par les billes est maintenant réalisée. Les aptamères CD63 et EpCAM sont utilisés.

5.a. Capture de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 dans un milieu biologique complexe en ciblant la protéine CD63

Dans un premier temps, la capture des EVs est réalisée avec les aptamères CD63-1 et CD63-2. La capture des EVs est similaire au protocole développé dans le **chapitre 3** lors de la capture d'EVs par les aptamères dans les tests ELASA.

D'une part, l'aptamère est tout d'abord mis en forme par une incubation à 90°C durant 3 minutes suivi d'une rampe décroissante de température durant 30 minutes jusqu'à température ambiante. La fonctionnalisation des billes par les aptamères est alors effectuée selon le protocole développé ci-dessus. D'autre part, l'échantillon d'EVs issues de cellules MCF-7, préalablement isolées par UC, est dilué (1 : 2) dans un échantillon de plasma, lui-même préalablement dilué au dixième.

Ensuite, la capture d'EVs $CD63^+$ est réalisée, par incubation des billes fonctionnalisées par les aptamères CD63-1 ou CD63-2, dans les tampons PBS supplémentés de $MgCl_2$ (respectivement 1 et 2 mM) durant une nuit, à 37°C, sous agitation. La détection de la capture est réalisée par l'anticorps de détection anti-CD81 puis l'anti-espèce HRP selon le protocole développé dans l'ELASA. Les étapes de lavage sont effectuées en centrifugeant les billes à 2 000 g durant 3 minutes. Le mélange brut, composé du complexe billes-aptamères-EVs ainsi que des billes seules et les EVs seules est dosé par lecture de l'absorbance à 605 nm, correspondant à la longueur d'onde de la couleur générée par la réaction enzymatique HRP-TMB (*Figure 4.16*). Le mélange à trier, d'environ 1 500 µL, est injecté dans le système DLD micro-ciblé sous pression (800 mbars). Le tri en taille est résolu en 1h30 environ. Le protocole complet est décrit en annexe.

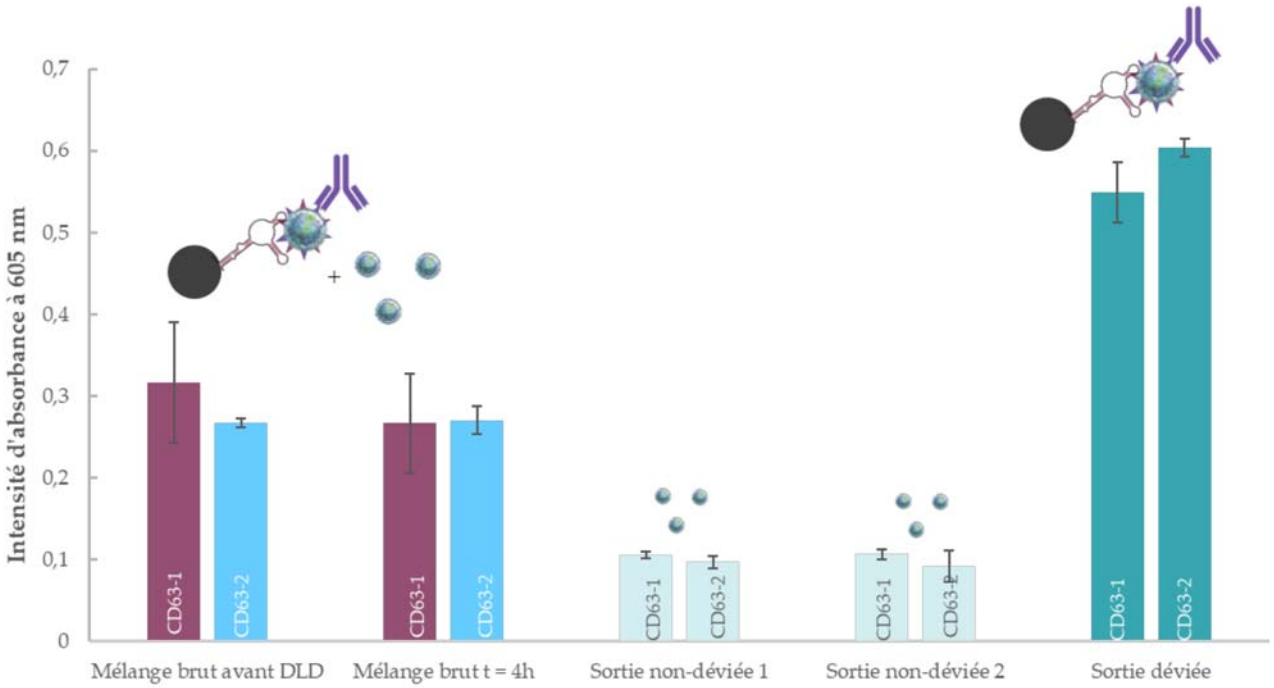


Figure 4.16 : Capture des EVs issues des cellules MCF-7 par les aptamères CD63-1 et CD63-2 supportés associée au tri par le système DLD micro-ciblé. Histogramme des intensités d'absorbance lues à 605 nm résultant de la capture des EVs issues de cellules MCF-7 par les aptamères CD63-1 et CD63-2 sur des billes de polystyrène. Chaque condition représente un total de deux expériences.

Le mélange brut a une absorbance d'environ 0,3 à la fois pour l'aptamère CD63-1 et pour CD63-2. Cette absorbance est la signature de la capture d'EVs sur les aptamères mais aussi de la présence d'EVs libres (*Figure 4.16*). Ce complexe de capture semble être intègre après 4 heures à température ambiante. Suite au tri en taille par le système DLD micro-ciblé, les valeurs d'absorbance obtenues dans les différentes sorties corrèlent avec l'isolement d'un côté des EVs non-capturées (sorties non-déviées 1 et 2) et de l'autre de complexe billes-aptamères-EVs (sortie déviée). L'absorbance relative à un signal résiduel des sorties non-déviées est trois fois moins important que celui relatif au mélange brut pour les deux aptamères CD63-1 et CD63-2., tandis que les signaux d'absorbance des sorties déviées sont deux fois supérieurs au mélange initial (*Figure 4.16*). Ainsi, les EVs CD63$^+$ ont été isolées des EVs ne portant pas ce biomarqueur par combinaison d'un tri DLD micro-ciblé avec l'utilisation d'aptamères. Bien qu'elle semble effective, la capture d'EVs MCF-7 CD63$^+$ dans un échantillon de plasma ne comporte pas de contrôle négatif. En effet, le plasma sanguin comprend lui-même des EVs décorées avec la protéine constitutive CD63 pouvant intéragir avec les aptamères CD63-1 et CD63-2. Dans cette optique, il aurait, en effet, été intéressant de tester la capture d'EVs CD63$^+$ directement à partir d'un échantillon de plasma dilué. Cette approche de recherche de biomarqueurs cancéreux a été privilégiée dans le cadre de la validation d'une autre cible pertinente, la capture d'EVs MCF-7 EpCAM$^+$.

5.b. Capture de vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 dans un milieu biologique complexe en ciblant la protéine EpCAM

Pour l'aptamère EpCAM, une étude préalable est menée. Elle permet de répondre à une question majeure induite par cette stratégie : est-ce que toutes les EVs $EpCAM^+$ sont capturées par les aptamères présents sur les billes de polystyrène ?

Afin de tenter d'apporter une réponse, une expérience a été réalisée en incubant deux fois successivement l'échantillon d'EVs issues de cellules MCF-7 au contact des billes fonctionnalisées. La capture d'EVs $EpCAM^+$ a été réalisée par incubation des billes fonctionnalisées par l'aptamère EpCAM dans le tampon PBS supplémenté de 5 mM $MgCl_2$ durant une nuit à 37°C sous agitation. La détection de la capture a été réalisée par l'anticorps de détection anti-CD81 puis l'anti-espèce HRP selon le protocole développé dans l'ELASA. Avant l'injection dans le système de tri en taille DLD, le surnageant de l'échantillon biologique a été récupéré. Il contient les EVs ne s'étant pas accrochées aux aptamères et potentiellement encore des EVs disposant de la protéine EpCAM à leur surface. Une seconde incubation de ce surnageant avec des billes fonctionnalisées avec l'aptamère EpCAM a été réalisée sur la nuit et le même protocole de détection et d'isolement par le système DLD micro-ciblé a été mis en œuvre.

Figure 4.17 : Capture successive d'un échantillon complexe d'EVs issues de cellules MCF-7 par l'aptamère EpCAM supporté associée au tri par le système DLD micro-ciblé. Histogramme des intensités d'absorbance lues à 605 nm résultant deux captures successives d'EVs MCF-7 par l'aptamère EpCAM sur des billes de polystyrène. Chaque condition représente un total de deux valeurs d'une même expérience.

Les valeurs d'absorbance obtenues lors de l'incubation n°1 montre la détection de la capture des EVs par les aptamères dans le mélange brut et ces EVs sont collectées dans la sortie déviée (*Figure 4.17*). Lors de la seconde incubation, l'absorbance du mélange brut est faible (0,12) et après le tri par DLD micro-ciblé, aucun signal caractéristique du complexe billes-aptamères-EVs n'est mesuré dans les différentes sorties.

Ceci traduit ainsi la non-capture d'EVs EpCAM⁺ par l'aptamère EpCAM supporté. Bien que cette expérience n'ait été réalisée qu'une seule fois, elle permet de donner une tendance quant à l'efficacité de la capture des EVs par le système d'aptamère EpCAM supporté.

Afin de confirmer la capture des EVs EpCAM⁺, l'expérience est répétée. Les EVs MCF-7 sont diluées dans du plasma permettant de considérer l'échantillon comme un modèle d'échantillon de plasma patient malade. Ce dernier est incubé en présence des billes fonctionnalisées par l'aptamère EpCAM dans le tampon PBS supplémenté de 5 mM $MgCl_2$ durant une nuit à 37°C sous agitation. Le mélange brut composé du complexe billes-aptamères-EVs ainsi que des billes seules et des EVs seules est dosé par lecture de l'absorbance à 605 nm (*Figure 4.18*). Le mélange à trier d'environ 1500 µL est injecté dans le système DLD micro-ciblé sous pression (800 mbars). Le tri en taille est résolu en 1h30 environ. Un contrôle négatif, pour s'assurer de la spécificité de l'aptamère EpCAM pour les EVs MCF-7 EpCAM⁺ a été réalisé, en ne supplémentant pas l'échantillon de plasma d'EVs MCF-7.

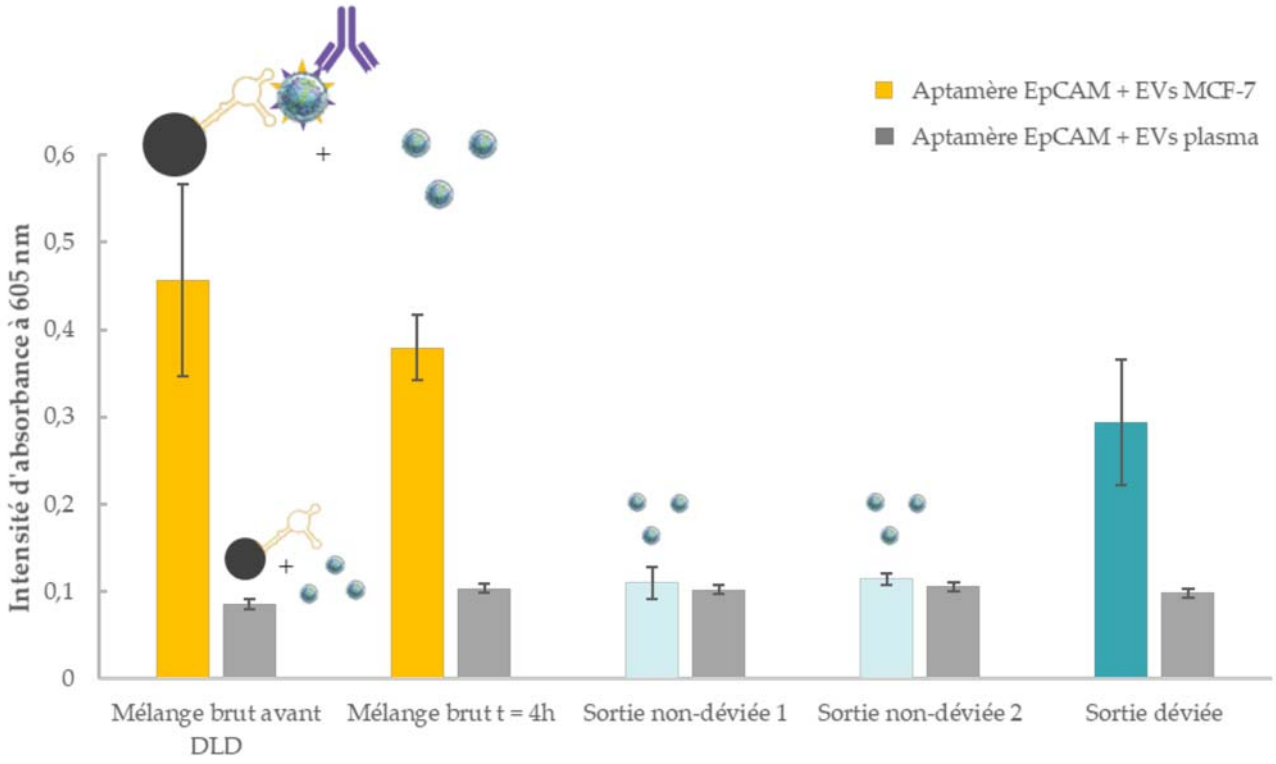


Figure 4.18 : Capture des EVs issues de cellules MCF-7 par l'aptamère EpCAM supporté associé au tri DLD micro-ciblé. Histogramme des intensités d'absorbance lues à 605 nm résultant de la capture des EVs issues de cellules MCF-7 par l'aptamère EpCAM sur des billes de polystyrène. La série d'histogrammes gris correspond au contrôle négatif : les EVs de plasma ne sont pas capturées par les billes-EpCAM. Chaque condition représente un total de deux expériences.

Le mélange brut a une absorbance d'environ 0,45. Cette absorbance est la signature de la capture d'EVs sur l'aptamère (*Figure 4.18*). Ce complexe de capture semble être intègre après 4 heures à température ambiante car l'absorbance mesurée est d'environ 0,4. Suite au tri en taille par le système DLD micro-ciblé, les valeurs d'absorbance obtenues dans les différentes sorties corrèlent avec l'isolement d'un côté des EVs non-capturées (sorties non-déviées 1 et 2) et de l'autre de complexe billes-aptamères-EVs (sortie déviée). L'absorbance relative à un signal résiduel des sorties non-déviées est quatre fois inférieure. Tandis que le signal d'absorbance de la sortie déviée est élevé quasiment équivalent à celui du mélange inital

(*Figure 4.18*). Ainsi, les EVs MCF-7 EpCAM$^+$ ont été isolées des EVs ne portant pas ce biomarqueur par combinaison d'un tri DLD micro-ciblé *via* l'utilisation d'aptamères. L'échantillon biologique ne contenant pas d'EVs MCF-7 (contrôle négatif) montre l'absence de capture d'EVs sur les billes fonctionnalisées par les aptamères. En effet, l'histogramme gris sur la *Figure 4.18* correspond à la capture d'EVs issues de plasma par l'aptamère EpCAM. Les EVs de plasma ne contiennent physiologiquement pas la protéine EpCAM et n'ont donc pas été capturées par les aptamères EpCAM supportés par les micro-billes. Ceci démontre la spécificité de la capture par l'aptamère EpCAM.

Ainsi, en partant d'un modèle d'un échantillon plasma patient malade, cette méthode de tri microfluidique associée au tri biomarqueur-spécifique par l'aptamère EpCAM permet la détection et l'isolement d'EVs EpCAM$^+$ en un temps relativement acceptable (une incubation sur la nuit suivie d'une matinée de tri DLD). De plus, les EVs MCF-7 ont été diluées au 1 : 2 dans du plasma. La LOD de l'ELASA de l'aptamère EpCAM de détection d'EVs MCF-7 a été étudiée dans le **chapitre 3** en format plaque 96-puits et la vérification de cette détection pourrait être effectuée sur le format capture sur billes.

6. Isolement biomarqueur-spécifique de vésicules extracellulaires par relargage contrôlé

La capture et le tri effectif des EVs CD63$^+$/EpCAM$^+$ par l'association DLD micro-ciblé-aptamères supportés ayant été démontrée précédemment, le relargage contrôlé des EVs d'intérêt peut être envisagé par ajout des brins complémentaires aux aptamères. On anticipe que les brins complémentaires vont s'hybrider aux aptamères modifiant la conformation structurelle de l'aptamère en ADN double hélice en libérant les EVs CD63$^+$/EpCAM$^+$. D'un côté les EVs d'intérêt CD63$^+$/EpCAM$^+$ seront isolées, de l'autre les billes fonctionnalisées par les aptamères hybridés avec leurs complémentaires seront collectées. La stratégie globale est résumée sur la figure ci-dessous (*Figure 4.19*). Une fois les EVs d'intérêt collectées, les sous-populations isolées pourront être caractérisées en termes de taille par NTA

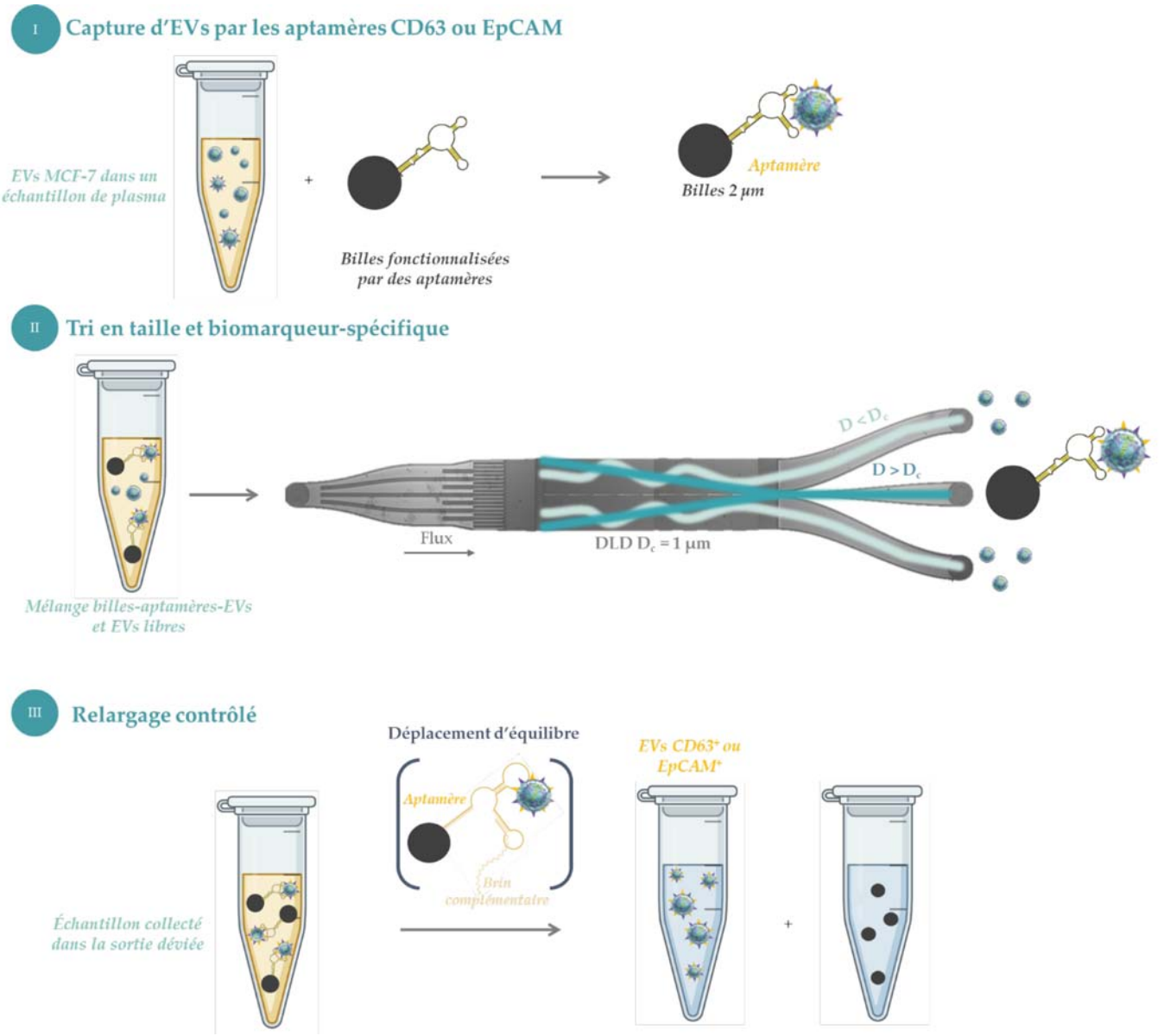


Figure 4.19 : Schéma de principe de tri microfluidique DLD micro-ciblé combiné à la capture d'EVs par des aptamères CD63 ou EpCAM supportés par des billes micrométriques suivi du relargage contrôlé des EVs d'intérêt. L'étape 1 correspond à la capture spécifique des EVs par les billes fonctionnalisées par des aptamères CD63 ou EpCAM. L'étape 2 permet le tri en taille et biomarqueur-spécifique des EVs d'intérêt (CD63⁺ ou EpCAM⁺). L'étape 3 correspond au relargage contrôlé des EVs par déplacement d'équilibre de l'aptamère.

6.a. Caractérisation de la distribution en taille des sous-populations de vésicules extracellulaires exprimant le marqueur CD63

Dans un premier temps, la caractérisation en taille des EVs CD63⁺ est envisagée. L'expérience de capture des EVs par l'aptamère CD63-1 supporté par les billes est réalisée puis est suivie du tri en taille par le système DLD micro-ciblé afin d'isoler les complexes billes-aptamères-EVs. Une fois collecté, l'échantillon dévié (100 µL environ) est incubé avec une solution contenant le brin complémentaire (CD63-1-c1 FAM) à 0,5 µM dans 200 µL de tampon d'hybridation durant 10 minutes, à température ambiante, sous agitation. La solution est ensuite centrifugée à 2 000 g durant 3 minutes afin d'isoler les billes précipitées du surnageant contenant les EVs CD63⁺ relarguées. Le surnageant est collecté tandis que le culot contenant les billes fonctionnalisées par les aptamères eux-mêmes hybridés à leurs complémentaires fluorescents est rincé puis resuspendu dans 200 µL de tampon de rinçage. Le protocole complet est décrit en annexe. Le

surnageant contenant les EVs d'intérêt relarguées d'une part, ainsi que les EVs non-capturées collectées dans les sorties non-déviées d'autre part, sont analysés par NTA. En effet, la corrélation des caractéristiques physiques et biochimiques des sous-populations d'EVs est une question posée par un grand nombre de scientifiques du monde des EVs et peu de réponses ont été apportées à ce jour[45,179,390,391]. L'analyse du profil en taille des sous-populations d'EVs en fonction de la protéine exprimée peut ainsi être intéressante dans l'objectif de la caractérisation des sous-populations exosomales. L'analyse NTA des EVs CD63⁺ *versus* EVs non capturées a été réalisée.

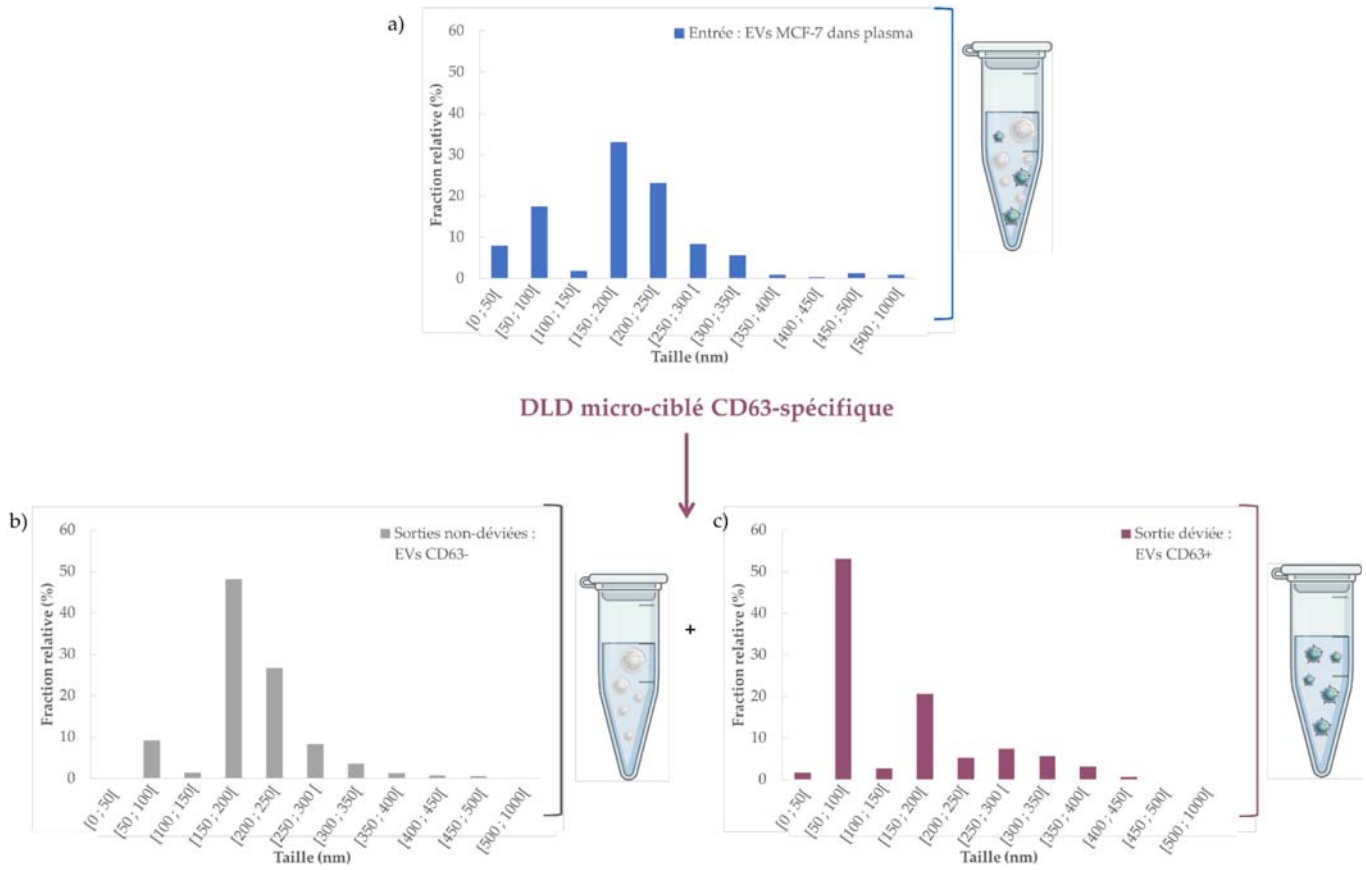


Figure 4.20 : Isolement d'EVs CD63⁺ par capture par l'aptamère CD63-1 combiné au tri DLD micro-ciblé. a) Histogramme du profil de taille des EVs issues des cellules MCF-7 isolées par UC ; b) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans les sorties non-déviées (CD63⁻) ; c) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans la sortie déviée et après relargage (CD63⁺). Chaque condition représente une expérience mais chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 2 000 particules.

L'échantillon initial d'EVs issues de cellules MCF-7 diluées dans du plasma a été analysé par NTA afin d'en extraire son profil de taille (*Figure 4.20a*). Deux sous-populations sont majoritaires : autour de 50-100 nm et autour de 150-250 nm environ (*Figure 4.20a*). La sortie déviée contenant les EVs relarguées après capture spécifique par l'aptamère CD63-1 est représentée par l'histogramme en violet (*Figure 4.20c*). Une grande majorité de la population CD63⁺ est présente entre 50 et 100 nm (*Figure 4.20c*). *A contrario*, la population d'EVs non capturées par l'aptamère CD63-1 et collectées dans les sorties non-déviées se situe entre 150 et 250 nm (*Figure 4.20b*). Bien que cette expérience n'ait pu être répétée qu'une fois au vu du temps imparti de la thèse, elle permet de donner des informations préliminaires quant aux tailles des sous-populations d'EVs disposant de la protéine CD63 à leur surface. Ceci permet d'orienter le fait que la sous-population d'EVs, qui dispose bien de la protéine membranaire CD63, est de taille relativement petite (50 à 100 nm)[390] et peut être assimilée aux exosomes.

En parallèle, la fluorescence FAM liée à l'hybridation des brins complémentaires sur billes est vérifiée à l'aide du spectrophotomètre lecteur de plaque (Infinite® M1000, **TECAN**) à 521 nm. La valeur de fluorescence permet de valider l'hybridation effective des brins complémentaires CD63-1-c1 aux aptamères supportés par les billes (*Figure 4.21*) et cela confirme le relargage effectif des EVs d'intérêt.

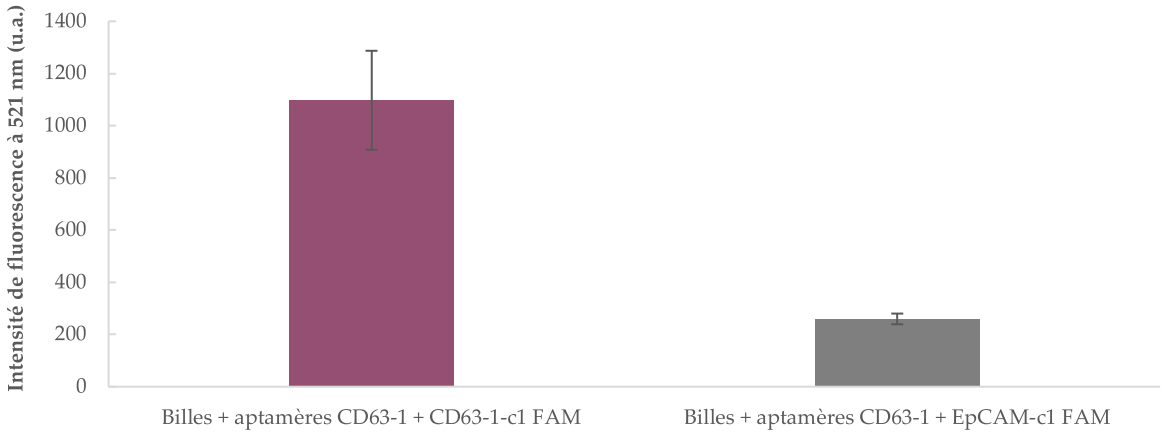


Figure 4.21 : Fluorescences liées à l'hybridation de brins complémentaires à l'aptamère CD63-1 supporté sur des micro-billes. La fluorescence FAM est lue à 521 nm après le relargage contrôlé des EVs d'intérêt, et limitant le relargage contrôlé lors de l'ajout des brins complémentaires EpCAM-c1. Ce contrôle permet d'assurer la spécificité du relargage contrôlé.

Pour conclure, cette expérience reste à consolider mais l'approche paraît effectivement intéressante pour fractionner les EVs en sous-populations et accéder ainsi aux exosomes.

6.b. Caractérisation de la distribution en taille des sous-populations de vésicules extracellulaires exprimant le marqueur EpCAM

Dans un second temps, l'analyse du profil de taille des sous-populations d'EVs EpCAM$^+$ est réalisée. L'expérience de capture des EVs par l'aptamère EpCAM supporté associée au tri par le système DLD micro-ciblé est répétée comme décrite ci-dessus. Une fois collecté l'échantillon dévié (100 µL environ) est incubé avec une solution contenant le brin complémentaire (EpCAM-c1 FAM) à 0,5 µM dans 200 µL de tampon d'hybridation durant 10 minutes à température ambiante sous agitation. La solution est ensuite centrifugée à 2 000 g durant 3 minutes afin d'isoler les billes précipitées du surnageant contenant les EVs relarguées. Le surnageant est collecté tandis que le culot, contenant les billes fonctionnalisées par les aptamères, eux-mêmes hybridés à leurs complémentaires fluorescents est rincé, puis resuspendu dans 200 µL de tampon de rinçage.

Le surnageant contenant les EVs d'intérêt relarguées ainsi que les EVs non-capturées collectées dans les sorties non-déviées, est analysé par NTA. L'analyse NTA des EVs EpCAM$^+$ *versus* EVs non capturées a été réalisée.

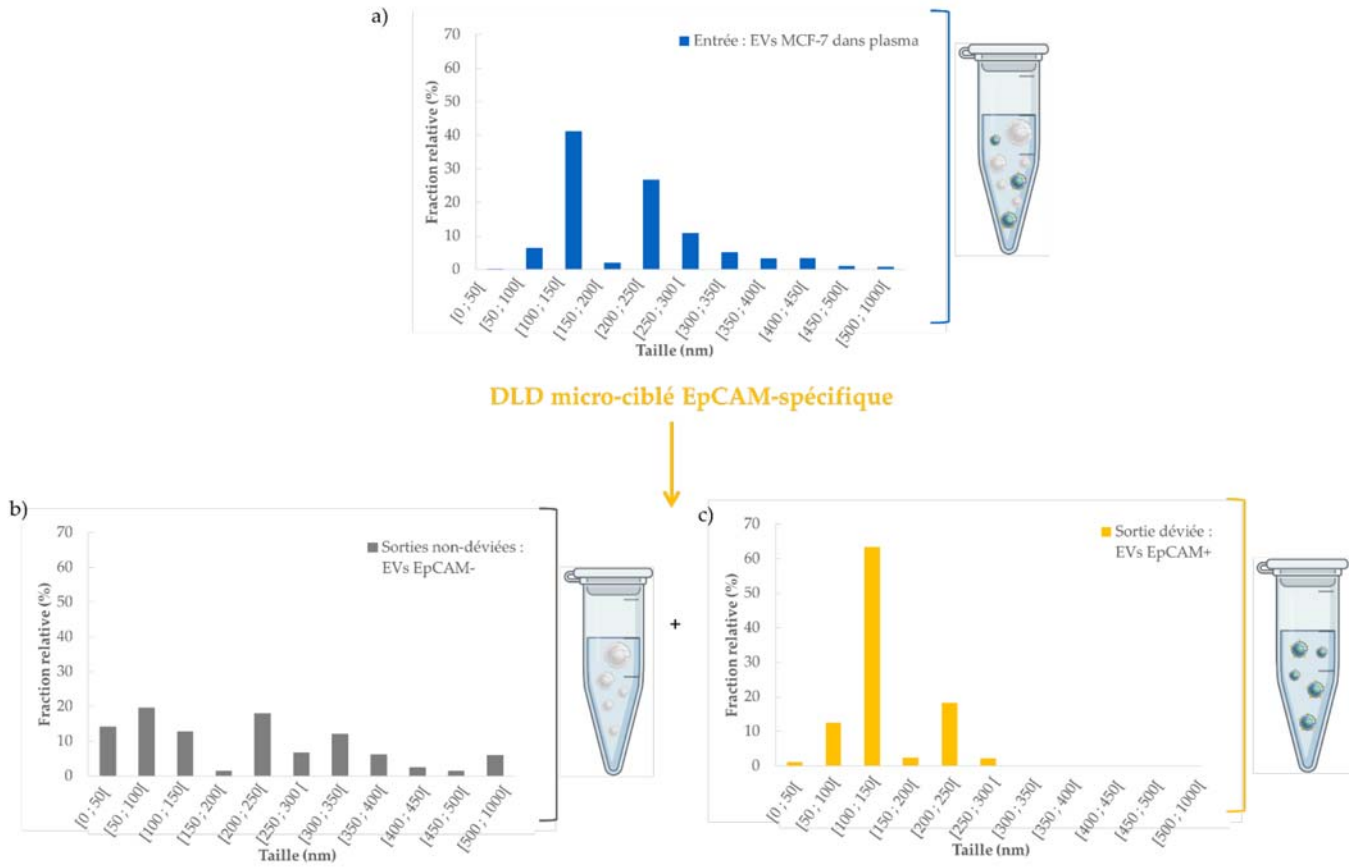


Figure 4.22 : Isolement d'EVs EpCAM⁺ par capture par l'aptamère EpCAM combiné au tri DLD micro-ciblé. a) Histogramme du profil de taille des EVs issues des cellules MCF-7 isolées par UC ; b) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans les sorties non-déviées (EpCAM⁻) ; c) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans la sortie déviée et après relargage (EpCAM⁺). Chaque condition représente trois expériences et chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 2 000 particules.

De la même façon que pour l'aptamère CD63-1, l'échantillon initial d'EVs MCF-7 diluées dans du plasma est analysé par NTA, afin d'en extraire son profil de taille (*Figure 4.22a*). Deux sous-populations sont majoritaires : autour de 50-150 nm et autour de 200-250 nm environ (*Figure 4.22a*). La sortie déviée contenant les EVs relarguées après capture spécifique par l'aptamère EpCAM est représentée par l'histogramme en jaune (*Figure 4.22c*). En ciblant la protéine EpCAM pour l'isolement d'EVs, le profil de population EpCAM⁺ apparaît plutôt similaire à celui de l'échantillon initial. À une exception près : la sous-population EpCAM⁺ ne dispose pas d'EVs mesurant plus de 300 nm (*Figure 4.22c*) d'après l'analyse NTA. La population non capturée par l'aptamère EpCAM semble, elle, présente de façon relativement uniforme entre 0 et 1 000 nm (*Figure 4.22b*). Cette expérience a pu être répétée trois fois et permet de conclure que la sous-population EVs EpCAM⁺ issues de cellules MCF-7 mesure entre 50 et 250 nm avec une grande majorité de la population entre 50 et 150 nm.

D'autre part, la fluorescence FAM liée à l'hybridation des brins complémentaires sur billes est vérifiée à l'aide du spectrophotomètre lecteur de plaque (Infinite® M1000, **TECAN**) à 521 nm. La valeur de fluorescence permet de valider l'hybridation effective des brins complémentaires aux aptamères supportés par les billes (*Figure 4.23*). Une vérification de la spécificité de la séquence complémentaire à l'aptamère pour le relargage contrôlé est effectuée par ajout du complémentaire CD63-1-c1 dans les mêmes conditions et la fluorescence associée est relativement faible (*Figure 4.23*).

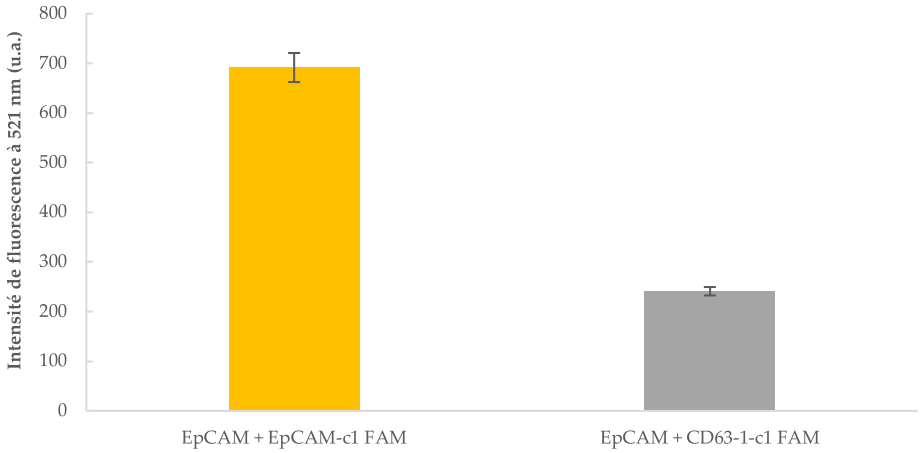


Figure 4.23 : Fluorescences liées à l'hybridation de brins complémentaires à l'aptamère EpCAM supporté sur des micro-billes. La fluorescence FAM est lue à 521 nm après le relargage contrôlé des EVs d'intérêt permettant l'hybridation des brins complémentaires CD63-1-c1 à l'aptamère EpCAM supporté par des micro-billes, et limitant le relargage contrôlé lors de l'ajout des brins complémentaires EpCAM-c1. Ce contrôle permet d'assurer la spécificité du relargage contrôlé.

Pour conclure, une analyse de comparaison des distributions en taille des EVs qui expriment la protéine CD63 *versus* EpCAM peut être réalisée. En effet, les EVs CD63$^+$ ont une distribution entre 0 et 150 nm tandis que les EVs EpCAM$^+$ ont une distribution plus hétérogène entre 75 et 250 nm.

Globalement, d'après les analyses NTA, la quantité d'EVs capturées par les aptamères comparée à la population totale d'EVs de l'échantillon initial est assez faible, de l'ordre de 5 à 8% en fonction des expériences et des aptamères utilisés. Sachant que lors de l'expérience de capture successive d'EVs MCF-7 par l'aptamère EpCAM, après la première incubation, très peu d'EVs EpCAM$^+$ semblaient être encore présentes dans l'échantillon biologique (*Figure 4.17*). La question concernant la quantité d'EVs exprimant la protéine EpCAM à leur surface parmi la totalité d'EVs issues des cellules cancéreuses MCF-7 persiste après cette étude. D'après les expériences de relargage contrôlé, cette population semble assez faible (5 à 8%) mais cela mériterait d'être approfondi en réalisant des analyses biochimiques quantitatives de type ELISA direct quantitatif ou de la cytométrie en flux comme récemment décrit par une équipe de recherche canadienne[392]. Pour cela, il faudrait veiller à recueillir une quantité significative d'EVs (solution d'une centaine de µL à 10^8 EVs/mL environ).

7. Conclusions et Perspectives

Pour conclure, une nouvelle méthode de tri microfluidique biomarqueur-spécifique supportée par des billes micrométriques a été développée pour permettre l'isolement spécifique d'EVs exprimant un biomarqueur d'intérêt. Cette méthode permet d'extraire deux sous-populations d'EVs en utilisant deux tailles de billes différentes ciblant chacune un biomarqueur d'intérêt.

Le système DLD micro-ciblé a été développé avec un réseau symétrisé présentant un $D_c = 1$ µm. Les nombres de Peclet et Reynolds ont été calculés et ont permis de démontrer que les particules triées sont soumises uniquement à la convection et que le régime d'écoulement du fluide est laminaire dit de Stockes. Ceci a permis de s'assurer, en amont de la fabrication des composants DLD, de points clés en mécanique des fluides dans les systèmes DLD. L'intégration fluidique a été réalisé à l'aide d'une carte fluidique COC composée d'une carte plastique associée à un cadre métallique aimanté. Le tri en taille du système DLD micro-ciblé a permis de valider expérimentalement la déviation de billes de 2 µm. Afin d'implémenter la fonction de tri biomarqueur-spécifique par les aptamères dans la méthode, la fonctionnalisation de micro-billes a été réalisée par greffage des différents aptamères en utilisant le couplage biotine-streptavidine. De plus, les expériences de déplacements de brins complémentaires aux aptamères ont permis de montrer le déplacement d'un brin complémentaire court par un brin plus long et de valider la fonction de relargage des EVs. Une fois tout cela mis en œuvre, la méthodologie de capture d'EVs par les aptamères supportés sur des micro-billes associée au tri DLD micro-ciblé a permis d'isoler d'un côté les complexes billes-aptamères-EVs et de l'autre les EVs sans biomarqueurs d'intérêt. Les EVs ont été relarguées par ajout de brins complémentaires et ceci a permis d'analyser les sous-populations d'EVs exprimant les biomarqueurs d'intérêt, CD63 et EpCAM, par NTA. *A priori*, les sous-populations $CD63^+$ mesurent majoritairement entre 50 et 100 nm de diamètre tandis que les sous-populations $EpCAM^+$ ont une majorité de leur population établie entre 50 et 150 nm. Il serait particulièrement pertinent de vérifier l'expression des protéines ciblées par une méthode classique de biochimie telle que le WB. Un point limitant dans la réalisation de ce contrôle est la faible quantité d'EVs isolées par capture alors que les expériences de WB demandent une grande concentration d'EVs afin de détecter la protéine d'intérêt (une centaine de µL à 10^{10} EVs/mL).

En tant que perspectives, il pourrait être intéressant d'associer le tri en taille CD63-spécifique suivi du tri en taille EpCAM-spécifique afin de faire un premier tri en ciblant les exosomes puis un second en ciblant uniquement les exosomes sécrétés par des cellules cancéreuses ($EpCAM^+$).

De plus, il paraîtrait pertinent de tester cette méthode de tri DLD couplée à l'aptamère EpCAM avec des échantillons patients en collaboration avec un établissement hospitalier de façon à confronter la méthode aux besoins réels de diagnostic et vérifier que le système développé est compatible au chevet du malade. Cependant, quelques questions demeurent et la quantité d'EVs capturées par les aptamères sur les micro-billes en est une. Pour résoudre cela, faire une analyse de ME des complexes billes-aptamères-EVs pourrait être une approche intéressante bien que destructive pour les EVs et l'interaction aptamère-EVs lors de la préparation d'échantillon. En effet, ce type d'approche a récemment été décrite par une équipe chinoise où ils ont décrit la capture d'EVs à l'aide de sondes anticorps puis ont réalisé une analyse de ME mais cela apparaît impossible à mettre en œuvre à l'échelle de l'échantillon de patients[393].

Résumé – Méthode de tri microfluidique DLD micro-ciblé biomarqueur-spécifique pour l'analyse d'EVs

- Le développement d'un système DLD micro-ciblé avec un réseau de piliers symétrisé et disposant d'un D_c d'environ 1 µm a été réalisé. L'intégration fluidique de la puce silicium dans une carte plastique COC associée à un cadre en aluminium a été présentée. Le banc expérimental DLD composé d'un microscope, d'une caméra CCD, d'un régulateur en pression et d'un ordinateur de contrôle a été décrit.

- La validation expérimentale du dispositif de tri a été réalisée par la résolution d'un mélange de billes micrométriques (1 et 2 µm).

- L'implémentation de la fonction de capture par les aptamères a été validée *via* la fonctionnalisation de billes micrométriques par des sondes oligonucléotidiques.

- La méthode de tri biomarqueur-spécifique combinée au tri en taille par DLD a été développée avec les aptamères CD63 et EpCAM pour la capture spécifique d'EVs MCF-7 diluées dans un échantillon de plasma.

- Le relargage contrôlé des sous-populations d'EVs d'intérêt a permis d'établir un lien entre l'expression de la protéine d'intérêt et la taille de cette sous-population.

Chapitre 5 : Développement d'un système de tri microfluidique par DLD pour l'isolement de particules sub-micrométriques

Chapitre 5 – Développement d'un système de tri microfluidique par DLD pour l'isolement de particules sub-micrométriques

- Les défis techniques inhérents au développement du système DLD nano-ciblé seront abordés notamment en terme de conception, de paramètres fluidiques (résistivité, nombres de Peclet et Reynolds) et de positionnement vis-à-vis de l'état de l'art existant. Le procédé de fabrication de composants DLD nano-ciblés sera décrit. Différents D_c ayant un intérêt pour le tri d'échantillons d'EVs seront retenus. En aval, l'intégration fluidique haute pression sera développée.

- La méthode d'isolement d'EVs par le système DLD nano-ciblé $D_c = 350$ nm sera mise en œuvre et la comparaison avec la méthode standard d'UC sera effectuée. Différents types d'EVs seront isolés à partir du système DLD nano-ciblé $D_c = 350$ nm.

- Un deuxième système DLD nano-ciblé ($D_c = 140$ nm) pour le fractionnement en sous-populations des EVs sera initié. L'intérêt de ce système sera démontré avec des particules modèles.

- Finalement, la transposition du banc DLD nano-ciblé vers un automate DLD complet sera réalisée afin de permettre le futur transfert de la technologie auprès des utilisateurs biologistes.

Dans ce chapitre, le système DLD nano-ciblé est développé grâce aux connaissances acquises à partir du système DLD micro-ciblé. Des optimisations en termes de procédés de résistance fluidique, de fabrication silicium et de système microfluidique haute pression ont été réalisées afin de permettre le développement du système DLD nano-ciblé. Le *design* et la fabrication des composants DLD silicium, la carte fluidique ainsi que le banc expérimental seront décrits. Deux *designs* DLD ont été retenus pour le tri d'objets nanométriques disposant de deux D_c distincts : 350 nm et 140 nm. Dans un premier temps, le système DLD D_c = 350 nm sera étudié, et validé sur des échantillons modèles. Suite à cela il sera employé afin d'isoler les EVs issues de différents échantillons biologiques complexes. Le fractionnement en sous-populations des EVs sera envisagé avec le système DLD D_c = 140 nm. Finalement, les limites de la méthode mais aussi des techniques de caractérisation d'échantillon nanométrique hétérogène seront abordées et mises en perspectives.

1. De la conception d'un système DLD micro-ciblé vers un système DLD nano-ciblé : les défis techniques à relever

Le développement d'un système DLD micro-ciblé pour la mise au point d'une nouvelle méthode alliant tri en taille et biomarqueur-spécifique d'EVs d'intérêt a été décrit au **chapitre 4**. Pour rappel, le système DLD micro-ciblé dispose d'un D_c = 1 µm, c'est-à-dire qu'il sépare les particules dont la taille est supérieure à 1 µm des particules de diamètre inférieure à 1 µm. Ce système a permis d'isoler des EVs exprimant un biomarqueur d'intérêt en utilisant des billes comme support. Néanmoins, pour fractionner un échantillon d'EVs en plusieurs sous-populations, sur un critère de taille et/ou d'expression de biomarqueurs, nous proposons de concevoir des réseaux DLD avec des D_c nanométriques, sans l'utilisation de billes supports. Les EVs ont une gamme de taille de 50 à 300 nm. Les systèmes DLD nano-ciblés pour le tri de ces particules doivent nécessairement avoir un D_c de l'ordre de 100 à 400 nm selon l'application visée (isolement d'EVs : D_c ~ 300 nm et fractionnement en sous-populations D_c ~ 150 nm). Pour cela, il s'agit donc de diminuer drastiquement la taille des dimensions caractéristiques du réseau de piliers. Cependant, diminuer la taille des piliers et des espaces interpiliers a pour conséquence une densification du réseau et donc une nette augmentation de la résistance fluidique. Des réseaux DLD pour le tri de particules nanométriques ont déjà été développés, notamment par le centre de recherche d'**IBM** (New York, USA)[5,300,343]. Ces réseaux ont pour caractéristiques une géométrie et un espace interpilier en particulier de taille nanométrique pour accéder à des D_c nanométriques. Les piliers et les espaces interpiliers du réseau mesurent entre 200 et 300 nm et la hauteur des piliers est d'environ 1 µm. Ainsi, la résistance fluidique du réseau est très importante et l'échantillon injecté doit être pré-purifié afin d'éviter le bouchage de la puce. Afin d'obtenir un débit intéressant du point de vue de la préparation d'échantillon biologique compatible avec les systèmes actuels de biologie médicale et réduisant la durée d'analyse, le choix réalisé a été de paralléliser les dispositifs DLD (jusqu'à 1 024 composants en parallèle) pour traiter une quantité d'échantillon pertinente en un temps acceptable (900 µL/h). Une très récente publication de l'équipe rapporte un débit record de 17 mL/h en parallélisation 31 160 composants DLD[394].

Ainsi pour adresser le défi du développement de système DLD nano-ciblé, différents points techniques doivent faire l'objet d'amélioration :

- Les procédés technologiques de fabrication de substrat silicium DLD doivent être modifiés pour permettre une grande densité de motifs ;

- La diminution de la résistance fluidique des canaux DLD doit être aussi importante que possible ;
- L'interface fluidique des composants DLD doit permettre une mise en œuvre du système DLD à plus haute pression pour compenser la perte de charge du système ; cela passe également par une revue du système de *packaging* fluidique.

Une fois développé, ce dispositif DLD nano-ciblé permettra d'envisager l'isolement d'EVs à partir d'un échantillon complexe uniquement sur la discrimination en taille des particules. Ce système microfluidique est proposé comme une alternative à la méthode standard basée sur l'UC et a l'avantage d'être relativement simple d'utilisation, peu coûteux en échantillon et n'endommage pas physiquement les EVs. Le schéma de principe de tri microfluidique par DLD nano-ciblé est résumé ci-dessous (*Figure 5.1*).

Figure 5.1 : Schéma de principe de tri microfluidique DLD nano-ciblé pour l'isolement d'EVs à partir d'un échantillon biologique (milieu de culture cellulaire et plasma).

2. Développement de systèmes DLD nano-ciblés

Mis à part les exemples proposés par **IBM**, très peu de dispositifs DLD ciblant des particules de taille nanométrique sont décrits dans la littérature. La fabrication de tels composants nécessite des compétences et des équipements de pointe dont peu de centres de recherche disposent. L'adaptation du système DLD micro-ciblé en système nano-ciblé a donc été possible grâce au soutien technologique disponible au CEA Leti.

2.a. *Design* de composants DLD en silicium

Comme pour le système DLD micro-ciblé, les composants silicium DLD nano-ciblé développés (dénommées en interne DLD4) ont été conçus sur le format DLD symétrisé. En effet, deux réseaux de piliers légèrement désorientés par rapport au flux sont symétrisés le long d'un mur central, vers lequel les particules de taille supérieure au D_c sont déviées et réunies dans la sortie centrale. L'architecture du canal nano-ciblé est le même que celle du canal micro-ciblé. Ainsi, comme pour le système micro-ciblé, les composants DLD nano-ciblés comportent une entrée unique et trois sorties (*Figure 5.2*).

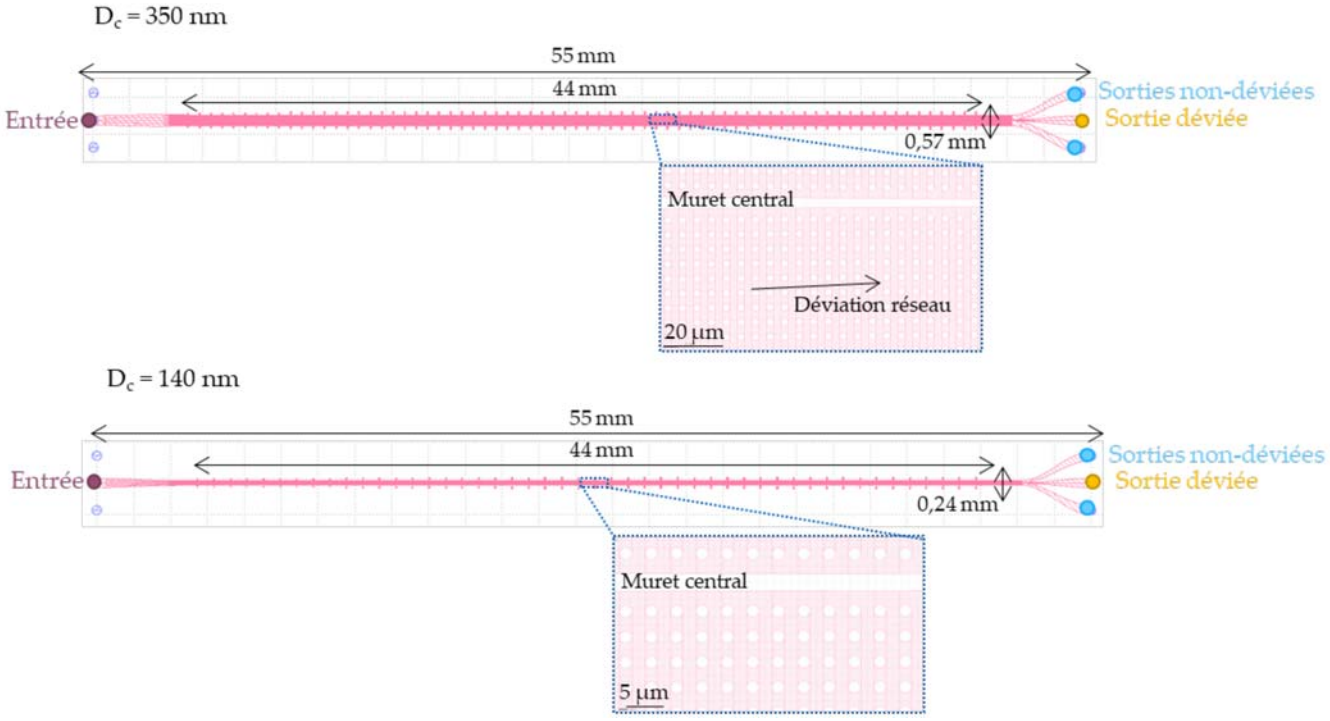


Figure 5.2 : Disposition des canaux DLD nano-ciblé.

Le positionnement stratégique proposé par le CEA Leti propose une géométrique du système DLD nano-ciblé différente de celle proposée par l'équipe de Stacey Gifford et Joshua Smith (**IBM**). En effet, une méthodologie a été développée afin de concevoir des composants DLD avec des D_c nanométriques mais disposant d'un réseau à géométrie micrométrique. L'objectif est en effet de conserver des dimensions micrométriques pour limiter la résistance fluidique (d'environ 10^{15} à 10^{17} Pa.s/m^3), et par conséquent d'augmenter le débit (180 µL/h avec un composant DLD, 900 µL/h avec 1 024 compostants pour **IBM**) et de limiter le bouchage. De plus, afin de maximiser le débit pour une puce DLD, des canaux de profondeur importante ont été réalisés (environ 50 µm). Cela a impliqué un certain développement technologique pour la gravure profonde du silicium car l'*aspect ratio* (ratio entre la hauteur et le diamètre du pilier) est élevé (environ vingt) et les structures fines (quelques µm). Pour la conception de ce système, les paramètres géométriques des piliers DLD ont été choisis à la fois en utilisant la loi de Davis afin de minimiser le D_c et la modélisation de la résistance hydraulique afin de maximiser le débit, de façon à atteindre un compromis entre l'optimisation du diamètre critique et l'optimisation du débit. Une interface Matlab a été développée pour faciliter le choix des paramètres géométriques micrométriques compatibles avec un certain D_c nanométrique sur la base des critères d'optimisation (*Figure 5.3*). Cette interface est issue du travail de modélisation de la résistance hydraulique et a été développée en amont de la thèse par Léopold Virot durant son contrat post-doctoral en 2017-2018.

Figure 5.3 : Interface du programme Matlab pour la définition des paramètres géométriques pour la conception de DLD nano-ciblé.

Deux D_c différents ont été retenus pour la conception des dispositifs DLD nano-ciblés en vue de l'isolement d'EVs à partir d'un échantillon biologique complexe et du tri de sous-populations d'EVs. Pour l'isolement d'EVs, un D_c = 350 nm a été retenu avec un diamètre de piliers et un espacement interpiliers de 2,5 µm. La largeur de sortie centrale mesurant 27,5 µm, l'échantillon dévié est recueilli dans un volume quatre fois plus petit et ainsi concentré d'un facteur 20 environ par rapport à l'échantillon brut injecté. Pour le fractionnement d'EVs en sous-populations, un D_c = 140 nm a été retenu et ses paramètres géométriques (diamètre des piliers et espacement interpiliers) sont de 1,5 µm. La largeur de sortie centrale mesurant 16,5 µm, de même que pour le système D_c = 350 nm, l'échantillon dévié est recueilli dans un volume sept fois plus petit et ainsi concentré d'un facteur 14 environ par rapport à l'échantillon brut injecté. Les dimensions caractéristiques des canaux DLD nano-ciblés sont résumées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 5.1*).

	DLD D_c = 350 nm	**DLD D_c = 140 nm**
Diamètre des piliers (D_p)	2,5 µm	1,5 µm
Espace interpiliers (G)	2,5 µm	1,5 µm
Nombre de période (N)	70	48
Profondeur du canal (H)	37,5 µm	33 µm
Longueur du réseau DLD (L)	44 mm	44 mm
Largeur du réseau DLD (W)	575 µm	243 µm
Longueur totale de la puce	55 mm	55 mm
Aspect ratio (AR) des piliers	15	22

Tableau 5.1 : Dimensions caractéristiques des canaux DLD nano-ciblés D_c = 350 nm et D_c = 140 nm.

De la même façon que pour la conception du système DLD micro-ciblé, il convient de vérifier que les hypothèses posées par le tri par DLD sont validées pour ces géométries aboutissant à un tri nanométrique. Pour rappel, la première hypothèse réside dans le fait que le flux doit avoir un écoulement laminaire dans le réseau de piliers. Dans un système DLD, on recherche un régime de type laminaire où les lignes de courant sont correctement identifiables. L'écoulement d'un fluide est qualifié par le nombre de Reynolds

(*Équation 5.1*), il est inférieur à 1 quand cet écoulement est laminaire et supérieur à 1 quand l'écoulement est turbulent.

Équation 5.1 : Calcul du nombre de Reynolds caractéristique de l'écoulement d'un fluide dans un système.

Afin de calculer le R_e des sytèmes D_c = 350 nm et 140 nm, la vitesse du fluide dans le canal DLD et la viscosité cinématique sont des paramètres préliminaires à calculer. La viscosité hydrodynamique des tampons utilisés est assimilable à la viscosité hydrodynamique théorique de l'eau ($\mu_{eau} = 1 \times 10^{-3}\ Pa.s$) comme cela a été démontré au **chapitre 4**.

Les vitesses des particules dans les systèmes DLD nano-ciblés sont calculées selon une équation démontrée dans le manuscrit de thèse de Davis de l'Université de Princeton en 2008[304] (*Équation 5.2*). Pour rappel, la pression à la sortie du canal DLD est associée à la pression atmosphérique.

Équation 5.2 : Vitesse des particules dans le canal DLD (m/s), d'après Davis[304].

Les vitesses des particules dans les systèmes DLD nano-ciblés sont résumées dans le *Tableau 5*.2. Une fois ces paramètres déterminés, les calculs des R_e sont effectués (*Tableau 5.2*). Pour rappel, le nombre de Reynolds traduit le régime d'écoulement du fluide. Dans ces deux cas, ils sont largement inférieurs à 1 ($1{,}77 \times 10^{-2}$ et $3{,}81 \times 10^{-3}$), l'écoulement du fluide est en régime laminaire et la turbulence ne vient pas modifier les lignes de flux régissant le tri en taille par le principe DLD. La première hypothèse est ainsi vérifiée.

	DLD D_c = 350 nm	**DLD D_c = 140 nm**
Vitesse des particules dans le canal DLD (m/s)	$7{,}10 \times 10^{-3}$	$2{,}55 \times 10^{-3}$
Nombre de Reynolds	$1{,}77 \times 10^{-2}$	$3{,}81 \times 10^{-3}$

Tableau 5.2 : Vitesses des particules et nombres de Reynolds associés aux systèmes DLD nano-ciblés D_c = 350 nm et D_c = 140 nm.

La seconde hypothèse repose sur l'advection des particules dans le fluide. En effet, les particules dans le réseau DLD doivent être soumises majoritairement à l'advection du flux et la diffusion de celles-ci n'est pas souhaitable afin d'obtenir un tri en taille efficace. Pour cela, le calcul du nombre de Peclet mesurant l'advection *versus* la diffusion est pertinent (*Équation 5.3*).

Équation 5.3 : Calcul du nombre de Peclet comparant l'advection à la diffusion d'un fluide dans un système.

La diffusivité des particules est calculée en fixant à 25 nm le rayon des particules (particules de diamètre 50 nm, particules les plus petites), elle est égale à $8{,}73 \times 10^{-12}$ m²/s à 25°C. Les différentes composantes du nombre de Peclet déterminées, les P_e des système DLD nano-ciblés sont résumés dans le *Tableau 5.3*.

	DLD D_c = 350 nm	DLD D_c = 140 nm
Nombre de Peclet	$2{,}03 \times 10^3$	$4{,}38 \times 10^2$

Tableau 5.3 : Nombres de Peclet associés aux systèmes DLD nano-ciblés D_c = 350 nm et D_c = 140 nm.

Ces valeurs de P_e permettent d'affirmer que l'advection est majoritaire et que la diffusion des particules est un phénomène mineur dans le réseau de piliers et le tri en taille pourra être mené à bien dans les systèmes DLD nano-ciblés.

En parallèle, l'établissement des débits théoriques dans le canal DLD est effectué. Ce calcul du débit fait appel à la résistivité hydraulique liée au réseau DLD. La résistivité hydraulique et le débit théorique associés à chaque système DLD nano-ciblé sont calculés et rapportés dans le *Tableau 5.4*.

	DLD D_c = 350 nm	DLD D_c = 140 nm
Résistivité hydraulique (Pa.s/m³)	$8{,}29 \times 10^{15}$	$5{,}99 \times 10^{16}$
Débit théorique à 4 bars (µL/h)	348	48

Tableau 5.4 : Tableau récapitulatif des grandeurs physiques associées aux particules circulants dans les réseaux DLD nano-ciblés.

2.b. Fabrication en salle blanche des composants DLD en silicium

Comme pour les composants DLD micro-ciblés, la fabrication de ces modules DLD a été réalisée sur des *wafers* de silicium de 200 mm dans des salles blanches de microélectronique. Les technologies silicium sont particulièrement pertinentes dans le cas des DLD nano-ciblés, et notamment pour les plus petits dispositifs DLD, où les rapports hauteur/diamètre des piliers peuvent être fabriqués de manière fiable jusqu'à vingt, permettant ainsi l'optimisation du débit d'échantillon avec des canaux profonds.

Les étapes de fabrication sont les mêmes que celles rapportées au **chapitre 4** concernant les composants DLD micro-ciblés. Cependant, une petite particularité technologique liée au système DLD nano-ciblé est mise en œuvre pour le retrait des polymères de gravure. En effet, classiquement en microtechnologie, le retrait de ces polymères est effectué dans un bain de fluorure d'hydrogène (HF). Dans le cas de composants DLD nano-ciblés, les canaux sont profonds et la mouillabilité faible au vu de la densité de motifs. Un procédé de retrait des polymères de gravure basé sur du HF en phase vapeur a été spécifiquement développé pour atteindre le fond du canal sans toutefois générer de déformation du réseau de piliers (collage des piliers entre eux voire couchage des piliers).

Les résultats de la gravure sont présentés sur la *Figure 5.4*. Les piliers les plus petits en diamètre sont les plus difficiles à fabriquer, et selon leur AR il peut y avoir un risque que les plus petits piliers s'effondrent les uns sur les autres. Un AR minimum de 20 entre la hauteur et le diamètre des piliers a été atteint, ce qui est un résultat très satisfaisant. Les piliers de 1,5 µm présentent en effet des parois entièrement verticales, avec une taille très bien ajustée : 1,5 µm de diamètre en haut, comme en bas, et une profondeur de 33 µm dans le substrat de silicium. Les mêmes résultats ont été observés sur les piliers de 2,5 µm.

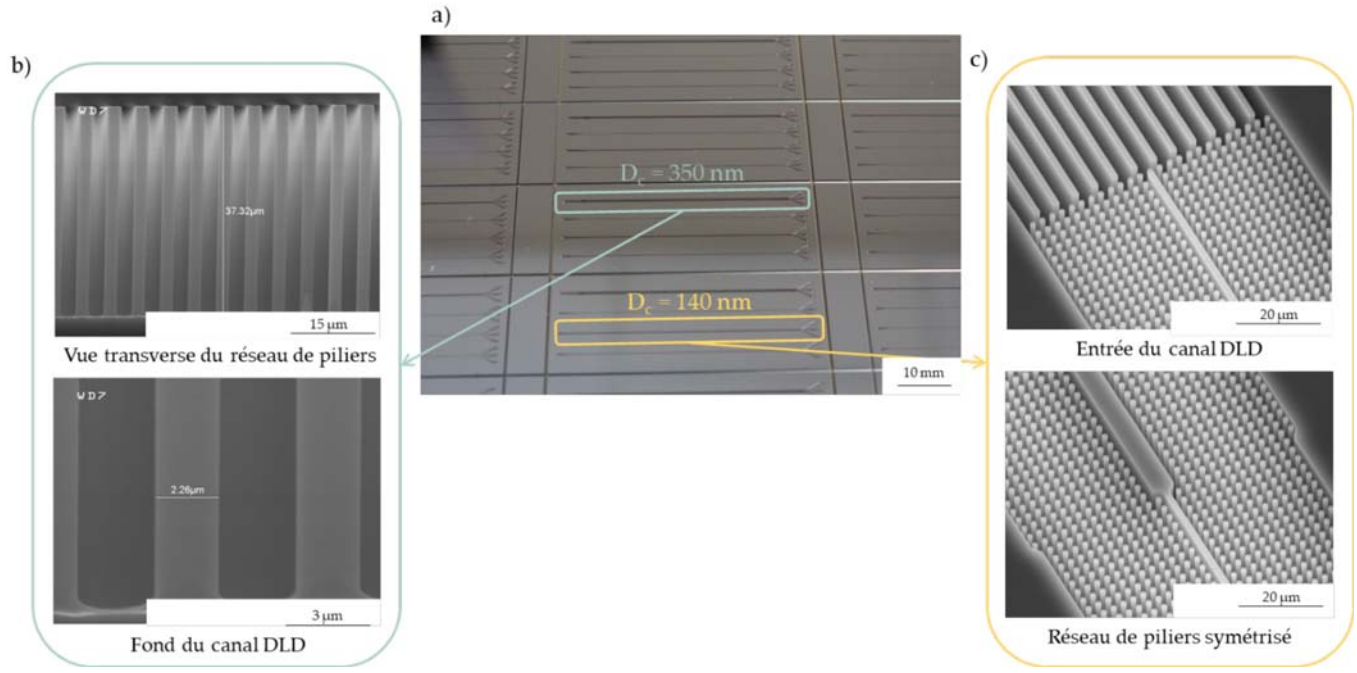


Figure 5.4 : Composants DLD nano-ciblés ; a) Wafers de composants DLD ; b) Vue MEB des piliers du réseau DLD D_c = 350 nm ; c) Vue MEB du réseau DLD D_c = 140 nm.

À la fin de la fabrication en salle blanche, les composants DLD sont sortis de la plateforme technologique, découpés et stockés au laboratoire à température ambiante.

2.c. Intégration fluidique : développement de carte fluidique haute pression

Une intégration fluidique supplémentaire a été développée pour traiter l'interfaçage des composants DLD dont le D_c est de taille nanométrique car la résistance hydraulique est significativement plus élevée dans ces cas. Les débits sont de l'ordre de 700 nL/min à 1 bar pour le système DLD D_c = 350 nm. Pour éviter cette limitation de débit voire compenser la résistance hydraulique du réseau, une augmentation de la pression d'entrée (jusqu'à 5 bars) a été nécessaire, ce qui a permis de réduire la durée de la phase de tri. Malheureusement, cette augmentation de la pression est incompatible avec la carte fluidique développée pour le système DLD micro-ciblé (carte plastique associée à un cadre métallique aimanté). Afin de solutionner cela, un nouveau type de carte fluidique dédié à des pressions plus élevées a été développé à l'aide de cadres vissés. Ce type d'intégration fluidique est présenté sur la *Figure 5.5*. De la même façon que pour le système DLD micro-ciblé, la carte plastique COC est équivalente au format d'une carte de crédit et est usinée à l'aide d'une fraise avec une précision micrométrique. Cette carte COC est constituée de plusieurs cartes COC assemblées après l'usinage par scellement sous presse. Des joints entre le cadre métallique et la carte plastique COC ont été ajoutés afin d'assurer l'étanchéité entre la carte plastique COC et les tubes d'entrée/sorties.

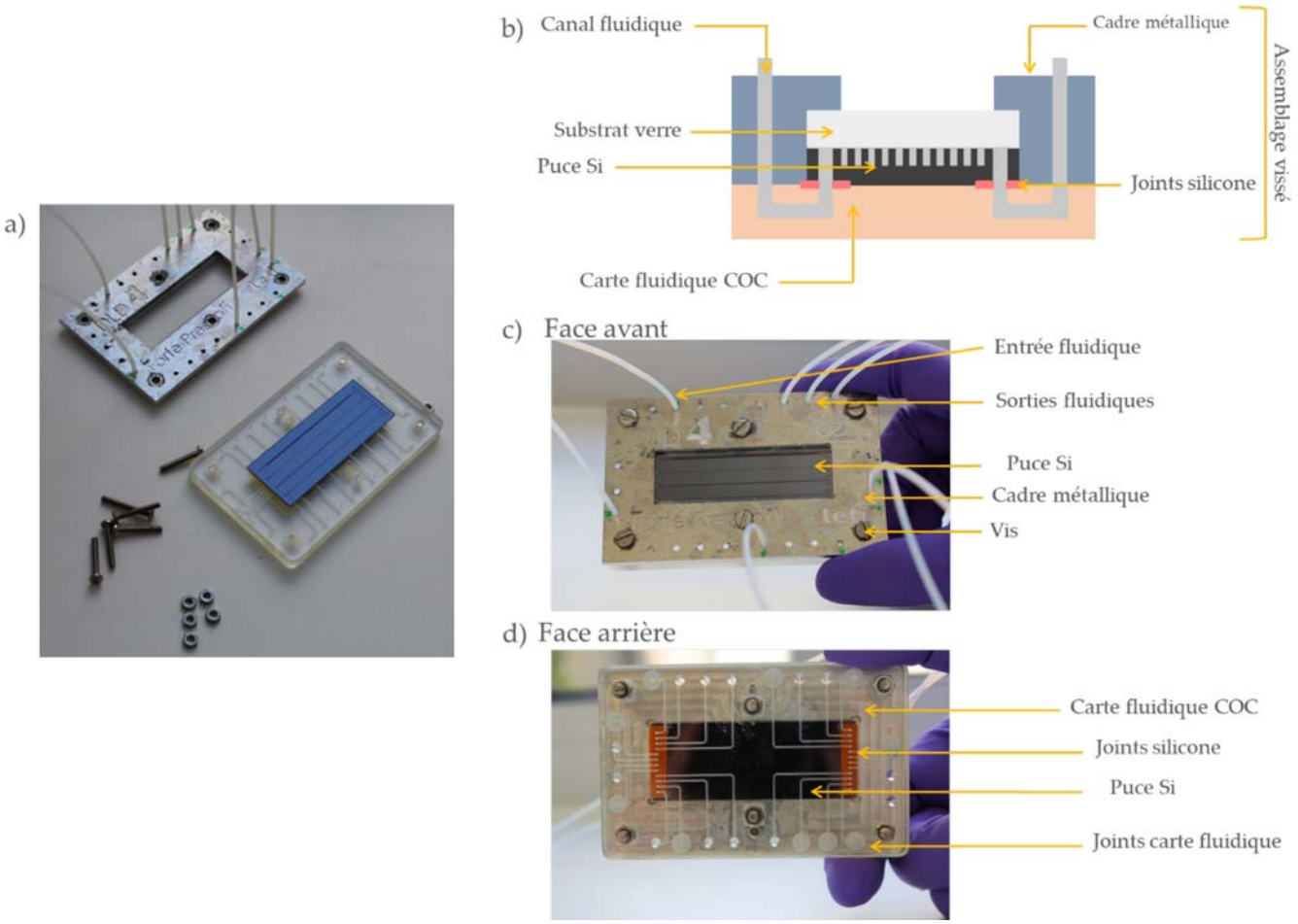


Figure 5.5 : Dispositif DLD nano-ciblé ; a) Carte fluidique haute pression (carte plastique et cadre métallique) associée à la puce DLD silicium non assemblée ; b) Schéma de la vue en coupe du système fluidique DLD haute pression ; c) Carte fluidique haute pression assemblée avec le composant DLD nano-ciblé face avant ; d) Carte fluidique haute pression assemblée avec le composant DLD nano-ciblé face arrière.

2.d. Banc expérimental DLD nano-ciblé

Le banc expérimental est le même que celui utilisé pour le système DLD micro-ciblé à quelques adaptations près. Une fois la puce DLD montée dans la carte fluidique haute pression, le fluide d'intérêt est injecté en utilisant un contrôleur en pression (MCFS-FLEX, **Fluigent**). Le système de DLD nano-ciblé est utilisé à une pression de travail de 4 bars équivalent à un débit d'environ 360 µL/h pour le système avec un D_c = 350 nm. Un microscope optique couplé à une source UV et équipé de cube-filtre pour la fluorescence et d'une caméra (CCD) permet l'observation de l'écoulement fluidique dans le canal DLD et l'enregistrement des trajectoires des billes fluorescentes. La collection des sorties fluidiques est réalisée dans des tubes Eppendorf. Le dispositif expérimental est présenté sur la *Figure 5.6.*

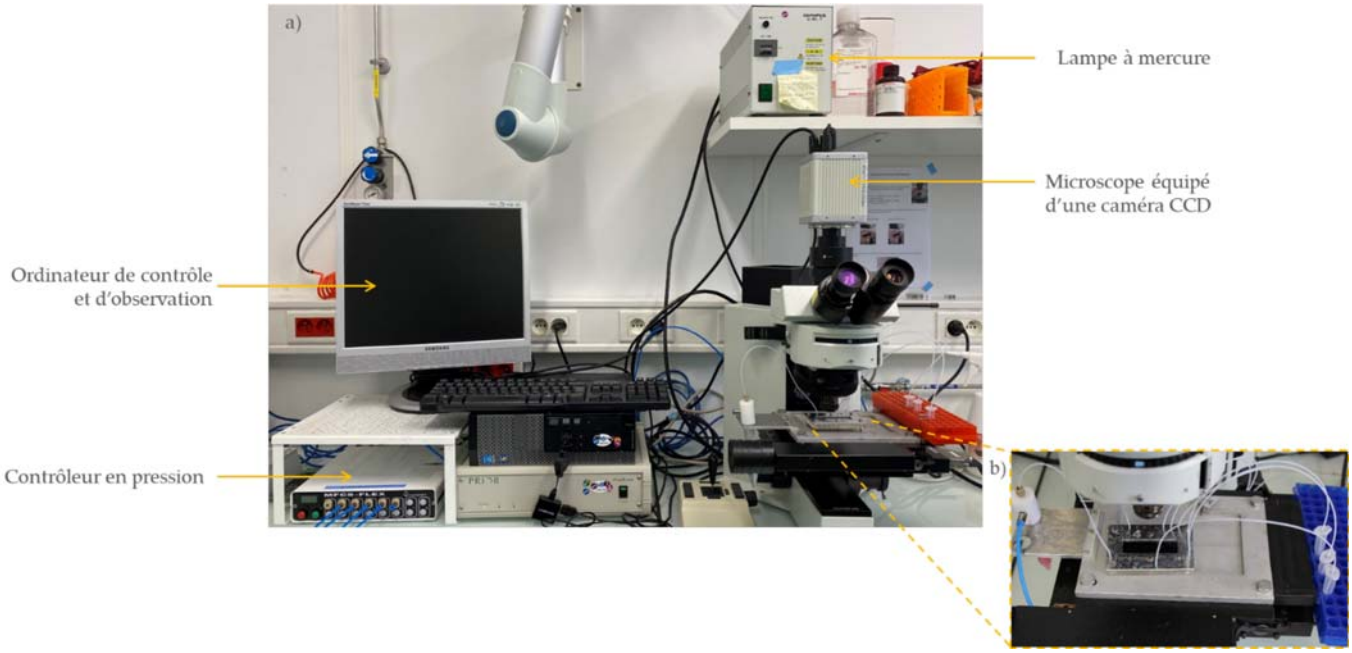


Figure 5.6 : Banc expérimental utilisé pour la caractérisation des composants DLD, montrant le microscope à fluorescence, ainsi que le contrôleur basé sur la pression. (b) Vue rapprochée de la carte fluidique haute pression sous l'objectif du microscope.

3. Le système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm pour le tri d'échantillon biologique complexe

Une fois les dispositifs DLD nano-ciblés développés, l'étude de ces dispositifs comme outil de préparation d'échantillon d'EVs a été réalisée, d'abord à partir d'un mélange de particules modèles puis à partir d'un milieu biologique complexe.

3.a. Utilisation du dispositif analytique DLD nano-ciblé D_c = 350 nm

En développant les dispositifs DLD nano-ciblés, deux D_c ont été retenus pour l'application au tri des EVs. L'un des deux systèmes est un système ayant un D_c de 350 nm avec une géométrie où le diamètre des piliers et l'espace interpiliers est de 2,5 µm. Ce système permet donc d'isoler d'un côté les particules dont la taille est inférieure à 350 nm et de l'autre, les particules dont la taille est supérieure à 350 nm. En effet, les EVs constituent une population polydisperse dont la taille se distribue entre 50 et 300 nm[3]. Extraire les débris cellulaires et les particules contaminantes de l'échantillon biologique à l'aide de la DLD D_c = 350 nm apparaît comme une alternative intéressante à la méthode standard de centrifugation différentielle non sélective en termes de tri en taille. En se basant sur le schéma complet d'isolement d'EVs par centrifugation différentielle, le système DLD D_c = 350 nm a été conçu pour remplacer trois étapes de centrifugation : le retrait des débris cellulaires à 10 000 g et les UC à 100 000 g. Le temps de manipulation est ainsi drastiquement réduit ainsi que le coût lié à l'utilisation de l'UC. La *Figure 5.7* représente un profil de distribution en taille typique obtenu par NTA des EVs isolées par centrifugation différentielle à partir de surnageant de milieu de culture de cellules MCF-7 associé à la gamme de taille des EVs donnée selon la définition de l'ISEV.

Figure 5.7 : Profil de distribution en taille et en concentration obtenu par NTA d'un échantillon d'EVs issues de cellules MCF-7 isolées par UC, l'aire sous la courbe représentée en bleu correspond à la taille des EVs décrite par l'ISEV.

Le choix d'un D_c à environ 350 nm apparaît donc pertinent pour le tri global d'EVs à partir d'un échantillon complexe. En effet, ce diamètre de coupure est une valeur estimée selon la formule empirique de Davis en 2006[395] : $D_C = 1{,}4G\ tan\,\theta^{0{,}48}$. Cependant, la valeur du D_c a une précision de l'ordre de +/- 50 nm[341] et ne permet donc pas une séparation stricte autour d'une valeur charnière.

3.b. Calibration du système de tri par des particules modèles

Ce système DLD novateur au laboratoire est muni d'un D_c nanométrique, la validation du dispositif a été envisagée en deux étapes. Tout d'abord, une vérification du D_c théorique a été réalisée par l'utilisation de billes en polystyrène rigides, fluorescentes et de tailles calibrées. Ensuite, la calibration du système par des particules modèles souples a été mise en œuvre afin de se rapprocher des EVs.

3.b.i. Billes modèles

Afin de valider le D_c théorique établi lors de la conception des composants DLD nano-ciblés, un mélange de billes de polystyrène fluorescentes (fluorescence rouge et verte) de deux tailles différentes (respectivement de 100 et 500 nm) a été injecté à une concentration de 10^9 particules/mL dans le composant DLD D_c = 350 nm. Ce mélange a été réalisé dans du PBS 1% Tween 20 (afin d'éviter l'agrégation des billes de polystyrène). La fluorescence des particules de 500 nm a été suivie tout au long du canal DLD. Trois emplacements (entrée ; centre ; sorties) sont notamment représentés sur la *Figure 5.8* où la déviation des plus grosses particules (500 nm) au centre du réseau de piliers jusqu'à la sortie centrale est mise en évidence.

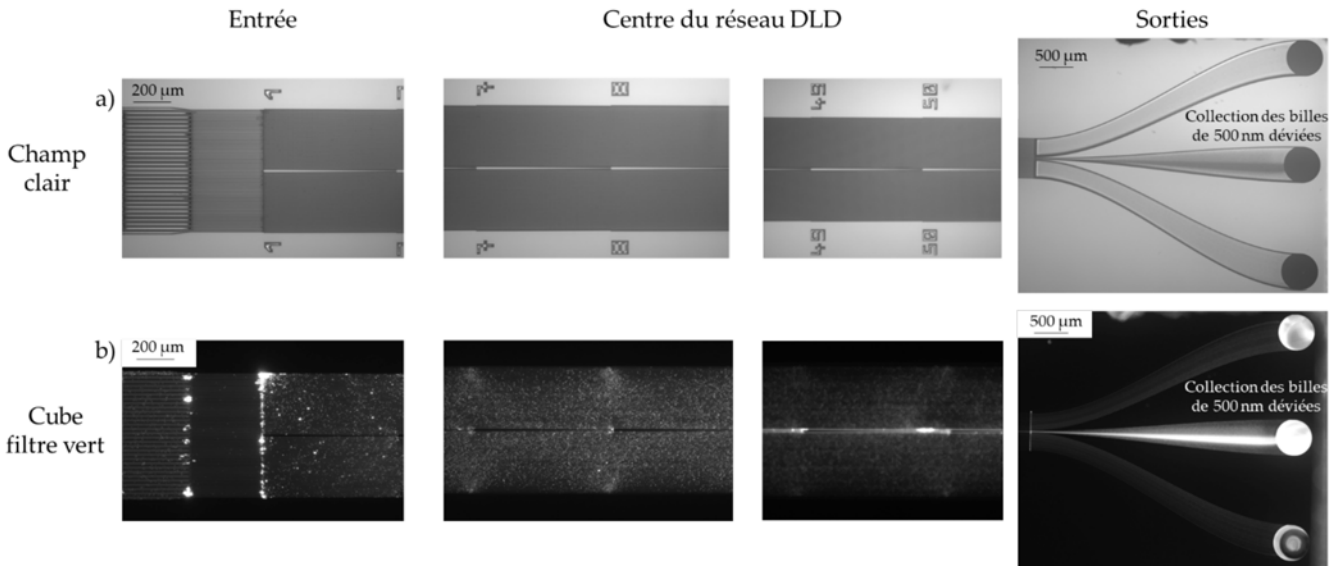


Figure 5.8 : Images de microscopie optique du réseau DLD nano-ciblé D_c = 350 nm obtenu après injection d'un mélange de billes fluorescentes de 100 et 500 nm, a) Images en champ clair du réseau DLD, b) Images de fluorescence obtenues avec le cube filtre vert correspondant aux billes 500 nm déviées le long du réseau DLD.

Afin d'évaluer la précision de tri de ce dispositif, la fluorescence du mélange de billes (Red et Green Fluoromax®) a également été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (Infinite® M1000, **TECAN**). Les niveaux d'intensité de fluorescence sont montrés sur la *Figure 5.9*. Une nouvelle fois, la fluorescence verte correspondant aux billes de 500 nm est collectée uniquement dans la sortie déviée, tandis que la fluorescence émise par les particules de 100 nm est collectée dans toutes les sorties du système, traduisant la non-déviation de ces particules. De plus, l'effet de concentration de la sortie déviée est observé entre les intensités de fluorescence de l'entrée *versus* la sortie déviée. Les billes de 100 nm ne sont pas déviées car leur taille est inférieure au D_c et sont donc présentes dans les trois sorties à une concentration équivalente. L'échantillon collecté dans la sortie déviée est enrichi en particules de taille supérieure au D_c et contient aussi les particules de taille inférieure au D_c injectées au centre à l'entrée du canal DLD. Ainsi, l'échantillon dévié n'est pas complétement pur *a contrario* des échantillons non-déviés.

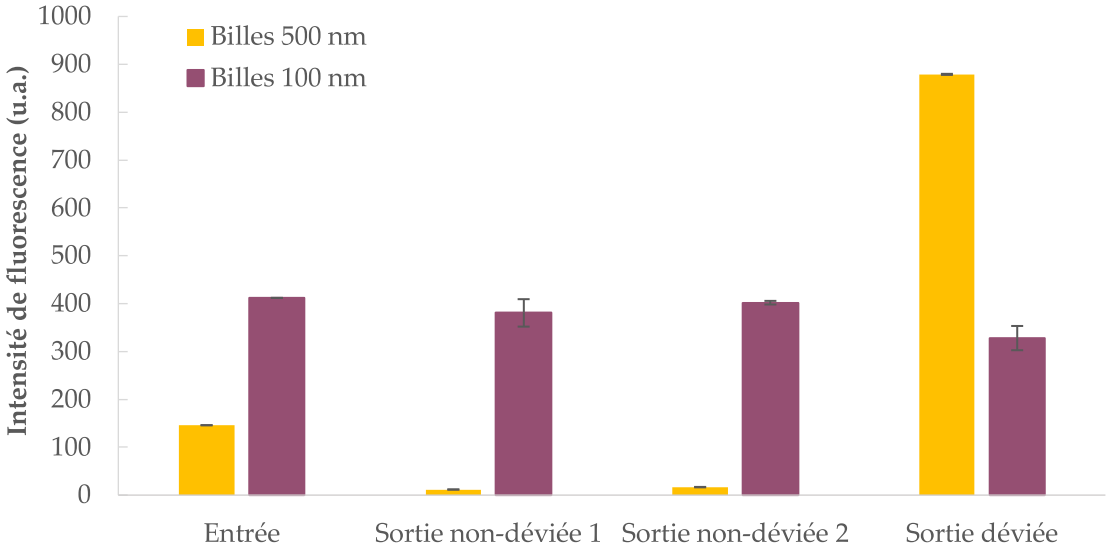


Figure 5.9 : Tri en taille d'un mélange de billes de 100 et 500 nm par le système DLD D_c = 350 nm. Intensités de fluorescence du mélange de billes (100 et 500 nm) mesurées aux différentes longueurs d'onde d'intérêt à l'entrée et dans les différentes sorties du système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm. Chaque condition représente un total de deux valeurs.

Ces résultats illustrent l'efficacité de tri atteint avec le système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm et permettent de valider expérimentalement la fonctionnalité de ce module DLD.

3.b.ii. Modèles biologiques simples

Afin de caractériser de façon précise le système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm et de se rapprocher des caractéristiques des particules d'intérêt, il est apparu intéressant de transposer la validation des billes fluorescentes à des particules modèles à membrane souple. Ainsi, pour les particules de petites tailles, les liposomes (vésicules lipidiques de synthèse) ont été le modèle de choix. Ils sont disponibles commercialement et ont été modifiés par ajout d'un marqueur fluorescent (FITC : $\lambda_{excitation}$ = 488 nm ; $\lambda_{émission}$= 521 nm). Le choix des particules de taille supérieure à 350 nm à membrane lipidique relativement bien calibrée en taille a été plus complexe. En effet, les liposomes sont très polydisperses aux environs de 500 nm et ne répondent donc pas au critère demandé. Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) se sont avérées être une source de particules calibrées plus pertinente car elles mesurent entre 1 et 2 µm de long et entre 500 et 800 nm de large, ce qui est compatible avec la géométrie du réseau DLD D_c = 350 nm (G = 2,5 µm).

A contrario des calibrations réalisées avec les billes, les expériences de tri utilisant les bactéries et les liposomes ont été réalisées de façon indépendante. Dans un premier temps, les bactéries *E. Coli* ont été cultivées pendant une nuit dans un milieu de culture liquide Luria Bertani (LB). Elles ont été centrifugées et resuspendues dans du PBS à une concentration d'environ 10^6/mL. On considère que le tampon PBS ne permet pas aux bactéries de se multiplier. La concentration a été fixée à 10^6/mL compte tenu du facteur de concentration induit par le dispositif DLD pour les particules déviées. En effet, cette dernière permet d'obtenir une gamme de concentration finale (en sortie de DLD) compatible avec un comptage pertinent : quelques dizaines à une centaine de bactéries dans les chambres de comptage des cellules de Malassez, de façon à en avoir suffisamment pour les voir et assez peu pour pouvoir les compter individuellement.

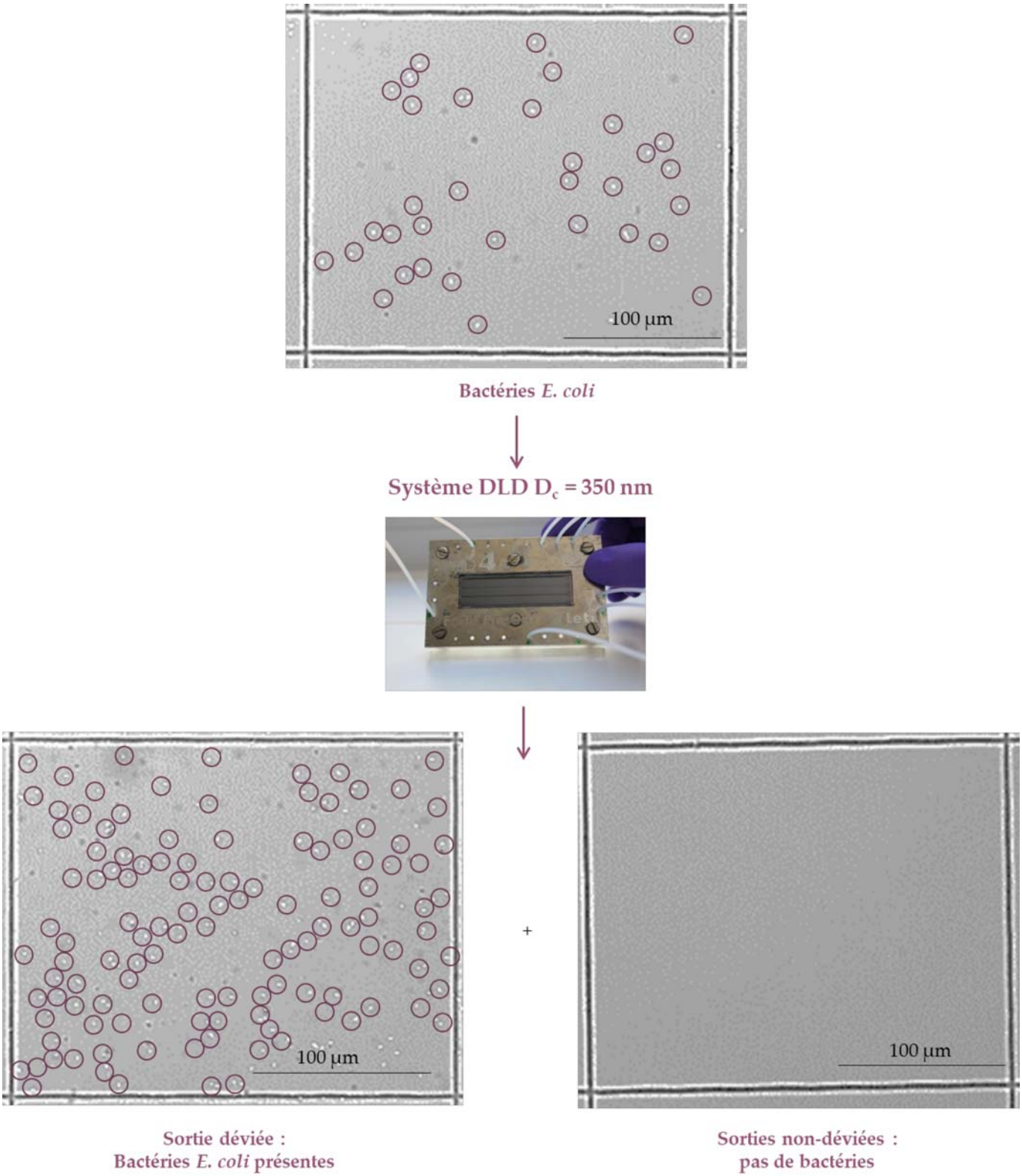


Figure 5.10 : Images de microscopie optique des bactéries comptées dans des cellules de Malassez avant le tri par DLD D_c = 350 nm et après le tri dans les sorties non-déviées et déviée. Pour faciliter la visualisation des bactéries sur les images, elles ont été entourées en violet.

L'échantillon bactérien a été injecté dans le canal DLD Dc = 350 nm à 2 bars puis la pression a été fixée à 4 bars en utilisant le régulateur en pression une fois le remplissage effectué. L'expérience est effectuée durant 6 à 8 heures afin d'obtenir environ 1,5 mL dans chaque sortie non-déviée et une centaine de µL dans la sortie déviée. Comme l'illustre la *Figure 5.10*, les bactéries ont été collectées dans la sortie déviée. Après comptage par cellule de Malassez, la concentration de la solution initiale de bactéries a été calculée

à environ $4x10^5$ bactéries/mL. Après tri par DLD, la sortie centrale contient $3x10^6$ bactéries/mL tandis que les sorties non-déviées contiennent chacune moins de 10 000 bactéries ($5x10^3$ bactéries/mL) ; ce qui correspond à moins de 3% de l'échantillon global (*Figure 5.11a*). Les cellules de Malassez permettent d'effectuer un comptage optimal de bactéries quand il y a entre 10 et 100 bactéries par rectangle de 0,01 cm^2. Afin de s'assurer de cela, les échantillons collectés dans les sorties non-déviées ont été concentrés d'un facteur 100 par centrifugation. Il est également intéressant de souligner la grande similitude entre les résultats obtenus sur les deux sorties non-déviées, ce qui traduit un fonctionnement du système DLD en accord avec ce qui est attendu.

Figure 5.11 : Tri en taille de particules biologiques modèles dans le système DLD D_c = 350 nm. a) Histogramme démontrant le tri en taille de bactéries E. coli qui sont déviées dans le système DLD D_c = 350 nm. Chaque condition des bactéries représente un total de quatre valeurs. b) Gamme étalon permettant d'établir une équation entre l'intensité de fluorescence et la concentration en liposomes. c) Histogramme démontrant le tri en taille de liposomes 150 nm FITC qui ne sont pas déviés et dont les concentrations obtenues dans les sorties du dispositif sont calculées à partir de mesures d'intensité de fluorescence.

Afin de vérifier la non-déviation des particules de taille inférieure à 350 nm, des liposomes commerciaux de 150 nm marqués FITC ont été utilisés. La solution commerciale est diluée à 10^{12} particules/mL, valeur minimale compatible avec la lecture de la fluorescence par le lecteur microplaque (Infinite® M1000,

TECAN). Indépendamment des expériences sur les bactéries, des liposomes fluorescents de 150 nm ont été injectés dans le canal DLD avec un D_c = 350 nm. Comme le montre la *Figure 5.11c*, la concentration de l'échantillon est presque identique, quelle que soit la sortie où l'échantillon a été prélevé et que l'échantillon provienne de l'entrée ou de la sortie. En d'autres termes, les liposomes ont circulé dans le canal DLD sans être triés, comme attendu dans ce dispositif, où le D_c est supérieur à la taille des particules.

Pour conclure, ce dispositif DLD nano-ciblé D_c = 350 nm a été testé avec des particules modèles, des bactéries de taille supérieure au D_c et des liposomes de 150 nm comme particules de taille inférieure. La déviation des bactéries dans la sortie centrale a été observée alors que les liposomes ont été collectés dans toutes les sorties, montrant qu'ils n'étaient pas déviés (les liposomes dans la sortie déviée sont les liposomes entrés au centre du réseau DLD). Ces résultats mettent en évidence le tri réussi des particules dans le système DLD avec D_c = 350 nm validant ainsi la fonctionnalité de ce système DLD nano-ciblé sur des échantillons biologiques modèle.

3.c. Isolement de vésicules extracellulaires

Suite aux différentes validations du système de tri DLD D_c = 350 nm, celui-ci est envisagé comme alternative à la méthode standard d'UC pour l'isolement d'EVs issues de milieux biologiques complexes.

3.c.i. Vésicules extracellulaires issues de cellules THP-1 : lignée modèle

Les EVs issues de cellules THP-1 ont été sélectionnées comme modèle pour la validation du dispositif DLD D_c = 350 nm. Le système DLD dispose d'espace interpiliers de 2,5 µm, cette taille permet donc de s'affranchir d'une pré-purification de l'échantillon biologique. Ainsi, les cellules THP-1 sont cultivées en conditions classiques dans le MEM enrichi en Glutamax® supplémenté avec 10% (v : v) de FBS et 1% (v : v) d'antibiotiques (mélange de Pénicilline et Streptomycine à 10 000 U/mL et 10 mg/mL). Le milieu est changé toutes les 48 à 72 heures et les cellules sont passées à 80% de confluence maximum soit environ 800 000 cellules/mL. 48 heures avant l'isolement d'EVs, le milieu est remplacé par du milieu MEM 10% FBS *exo-free*. Deux flasques (75 cm^2, 2 x 12 mL) sont collectées et le milieu est centrifugé à 300 g durant 10 minutes afin d'éliminer les cellules ; le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé à 2 000 g durant 10 minutes afin de retirer les cellules mortes.

L'objectif visé en utilisant le système DLD D_c = 350 nm consiste à s'affranchir des dernières étapes de centrifugation pour l'isolement d'EVs (*Figure 5.12*).

Figure 5.12 : Principe de transposition du protocole de centrifugation différentielle à l'utilisation du système DLD D_c = 350 nm pour l'isolement d'EVs.

L'échantillon contenant les débris cellulaires et les EVs est injecté dans le système DLD D_c = 350 nm à 2 bars pour le remplissage, et la pression est ensuite montée à 4 bars pour le reste de l'expérience. Cet échantillon a été préalablement concentré sur un filtre Amicon® Ultra-15K 100K et filtré à 1,2 µm afin de retirer les éventuelles particules de taille supérieure à l'espace interpiliers (2,5 µm) pouvant boucher le réseau de piliers. Généralement, le tri s'effectue en 6 heures, cela nous permet d'avoir un volume et une concentration d'échantillon suffisants pour l'analyse. La séparation s'étend donc sur 6 heures environ de façon à collecter environ 1 mL dans chaque sortie non-déviée et 100 µL dans la sortie déviée. Le protocole complet est décrit en annexe. Les différents échantillons des sorties sont analysés par NTA.

La *Figure 5.13* présente les résultats des différentes sorties analysées par NTA. L'analyse NTA permet d'aboutir à un graphique reliant la taille avec la concentration de l'échantillon. Afin de pouvoir comparer des échantillons de concentrations et de volumes différents dans le cas de l'analyse des échantillons collectés post-DLD, une normalisation des données brutes a été effectuée. De plus, la représentation en histogramme est permise par l'établissement d'intervalles (50 nm). L'échantillon biologique complexe (le surnageant de culture des cellules THP-1) est représenté sur la *Figure 5.13b* (histogramme bleu marine). Une fois l'échantillon trié en taille dans le système DLD D_c = 350 nm, la population des particules de taille inférieure à 350 nm est collectée dans les sorties non-déviées (*Figure 5.13d*, histogramme bleu turquoise). En effet, la proportion relative s'étend de 75 à 300 nm et très peu de particules ont une taille supérieure à 300 nm (*Figure 5.13d*, histogramme bleu turquoise). En parallèle, les particules de taille supérieure à 350 nm collectées dans la sortie déviée sont représentées sur la *Figure 5.13c* (histogramme gris). La population initiale d'EVs de taille supérieure à 300 nm est effectivement très majoritairement présente dans la sortie déviée (*Figure 5.13c*, histogramme gris). Ainsi, les débris cellulaires ont été isolés des EVs sur le critère du tri en taille par le système DLD D_c = 350 nm. Les EVs, définies comme des particules allant de 50 à 300 nm, sont donc collectées dans toutes les sorties et principalement dans les sorties non-déviées du système tandis que les débris cellulaires sont déviés et exclusivement collectés dans la sortie centrale. Il est tout de même intéressant de noter que la sortie déviée (*Figure 5.13c*, histogramme gris) contient à la

fois des débris cellulaires mais aussi quelques EVs, étant donné que les EVs injectées au centre du réseau DLD, non déviées, ont une trajectoire en zigzag et sont collectées dans la sortie déviée au centre.

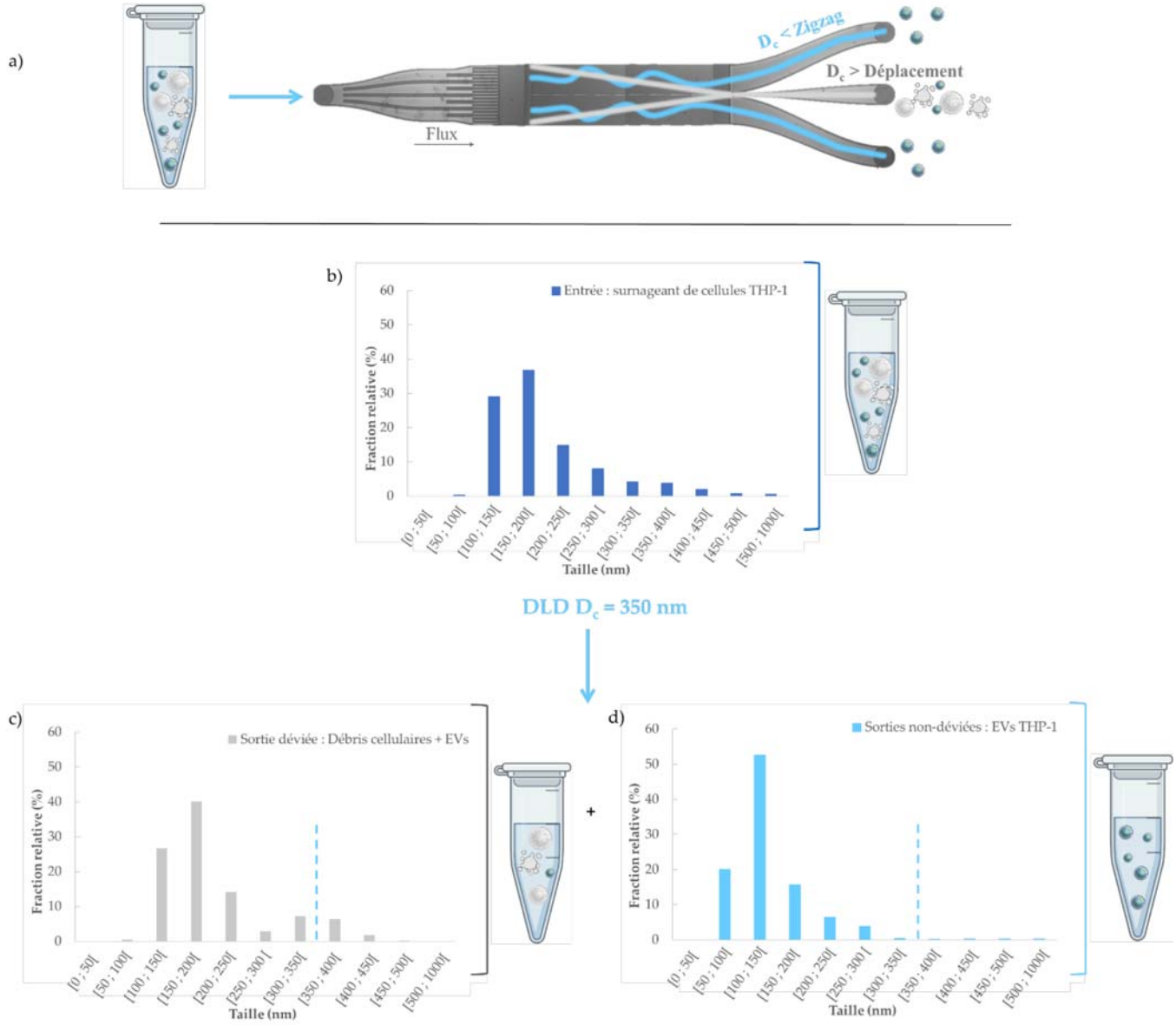


Figure 5.13 : Tri en taille d'EVs issues de cellules THP-1 par le système DLD D_c = 350 nm à partir de surnageant de culture cellulaire. a) Schéma de principe de séparation des EVs et des débris cellulaires. b) Histogramme du profil de taille du surnageant de cellules THP-1 ; c) Histogramme du profil de taille des débris cellulaires et EVs collectés dans la sortie déviée ; d) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans les sorties non-déviées. Chaque condition représente trois expériences et chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 5 000 particules.

Ces résultats encourageants pour le système DLD D_c = 350 nm demandent à être mis en regard de la méthode standard pour l'isolement d'EVs, basée sur l'UC. En effet, il peut être intéressant de comparer qualitativement les EVs isolées par le système DLD D_c = 350 nm et par la méthode de référence, l'UC. Ainsi, deux expériences parallèles d'isolement d'EVs ont été mises en œuvre. Une partie du surnageant de culture des cellules THP-1 a été traitée par le protocole d'UC décrit dans le **chapitre 2** et disponible en annexe. La seconde partie du surnageant a été traitée par le protocole décrit ci-dessus consistant en le retrait des cellules et cellules mortes puis au tri en taille par le système DLD D_c = 350 nm. Les échantillons contenant les EVs d'intérêt ont ensuite été analysés physiquement par NTA et cryo-TEM. La comparaison

des profils de taille et de concentration des EVs isolées par DLD D_c = 350 nm et UC est présentée sur la *Figure 5.14*. Globalement, les profils de taille sont très similaires avec notamment une même population majoritaire aux environs de 110 nm. Une seconde sous-population importante apparaît à environ 150 nm pour le système DLD D_c = 350 nm et plutôt aux environs de 170 nm pour l'UC. D'autres sous-populations plus minoritaires s'étendent entre 180 et 300 nm. La comparaison des profils de taille permet de conclure à une très forte similitude entre les EVs THP-1 isolées par DLD D_c = 350 nm et par UC d'après l'analyse NTA.

Figure 5.14 : Comparaison des profils de taille et de concentration d'EVs issues de cellules THP-1 isolées par le système DLD D_c =350 nm (courbe bleue) comparées aux EVs isolées par la méthode standard d'ultracentrifugation (courbe violette).

Secondairement, les EVs issues de ces deux expériences menées en parallèle ont été analysées par cryo-TEM. Le protocole utilisé pour la visualisation d'EVs par TEM avec préparation cryogénique de l'échantillon est décrit au **chapitre 2** et en annexe. Les images obtenues sont présentées sur la *Figure 5.15*. La plupart du temps, les EVs isolées par UC (*Figure 5.15a et b*) sont constitutivement intègres mais des altérations physiques (éclatement ou enchevêtrement) ont été observées (flèches jaunes) ; ceci pointe les inconvénients de l'UC en termes d'endommagement de l'échantillon d'EVs. En parallèle, la *Figure 5.15d et e* montre les EVs THP-1 isolées par DLD D_c = 350 nm. Aucune altération physique des EVs n'a été observée, permettant au système DLD de se placer comme une méthode d'isolement non-destructrice de l'échantillon d'intérêt.

Ces expériences ont permis d'observer une cinquantaine d'EVs à partir de trois échantillons différents. Les images présentées sont représentatives des observations faites. Néanmoins, une statistique plus importante serait nécessaire pour conclure définitivement sur l'approche non destructive du système DLD. En premier lieu, les résultats obtenus sont cohérents avec les forces appliquées sur les EVs isolées par l'UC d'une part, et pour la microfluidique d'autre part.

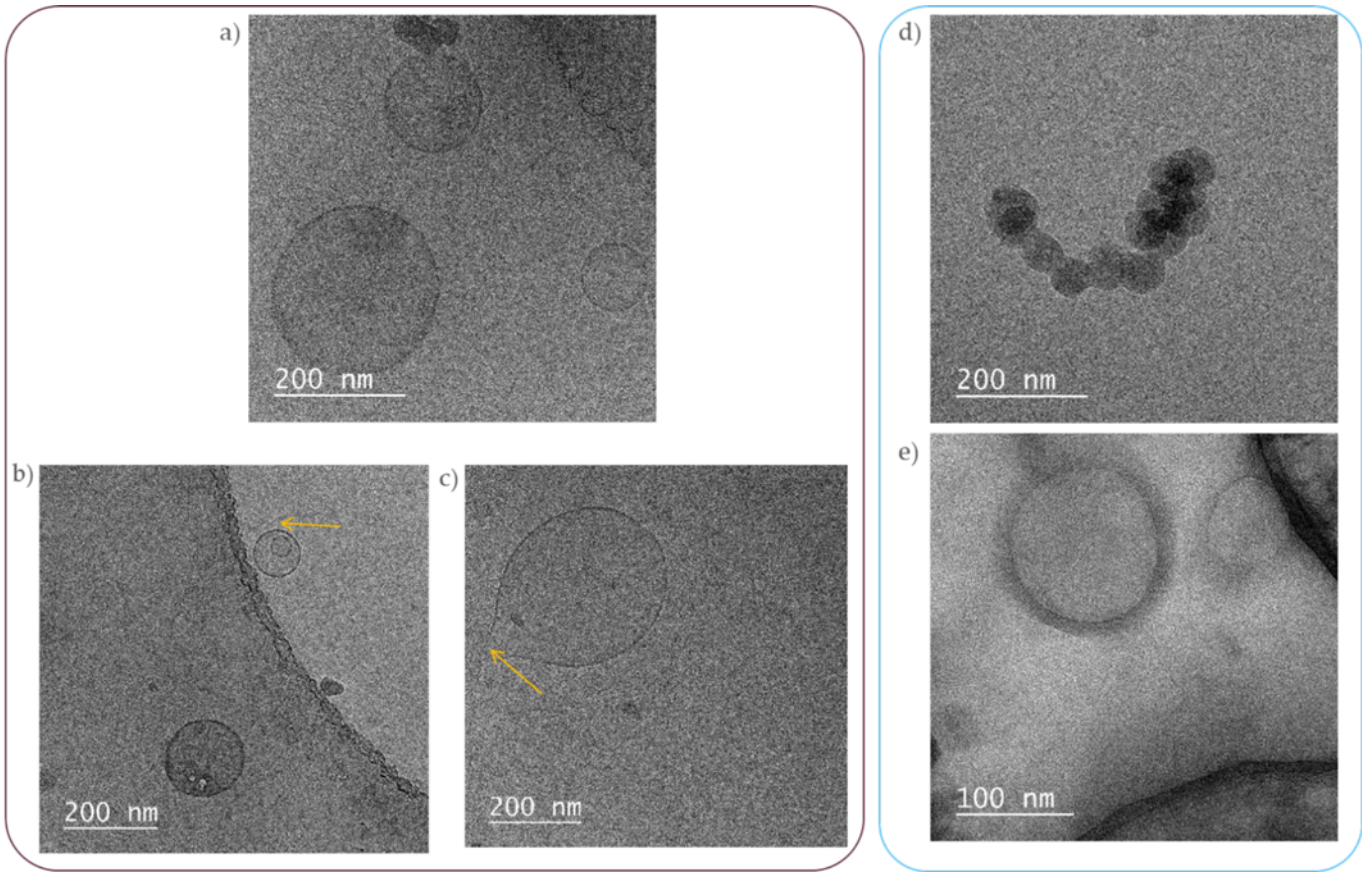


Figure 5.15 : Images de cryo-TEM d'EVs THP-1 ; a) b) c) Images de cryo-TEM d'EVs THP-1 obtenues par ultracentrifugation, différentes altérations des EVs sont visibles (éclatement et enchevêtrement) ; d) e) Images de cryo-TEM d'EVs THP-1 isolées par le système DLD D_c = 350 nm.

Pour conclure, les EVs THP-1 isolées par le système DLD D_c = 350 nm et par UC sont très similaires du point de vue de l'analyse NTA mais l'intégrité physique est préservée par isolement par DLD ce qui n'est pas le cas pour l'UC. Le système microfluidique a l'avantage indéniable d'être non-destructif pour l'échantillon *a contrario* de la centrifugation différentielle et des très grandes forces appliquées en UC. Par contre, la microfluidique ne permet pas de traiter des volumes d'échantillons comparables à ceux traités par UC (quelques mL *versus* dizaines de mL pour 6 heures d'expérience). Cependant, au vu de la grande concentration d'EVs présentes dans les liquides biologiques[141], la quantité d'échantillon biologique à analyser dans le cadre d'un diagnostic reste compatible avec les systèmes microfluidiques. Finalement, le temps d'analyse par DLD est légèrement plus restreint que par UC (5 heures *versus* 8 heures) mais le point clé réside dans le fait que l'analyse DLD ne nécessite pas l'intervention d'un opérateur une fois le milieu biologique injecté. Ceci n'est pas le cas pour l'UC où l'opérateur manipule nécessairement durant tout le protocole.

3.c.ii. Vésicules extracellulaires issues de cellules MCF-7 : généralisation de l'isolement de vésicules extracellulaires à partir de milieu de culture cellulaire

Dans l'optique de décliner le système DLD D_c = 350 nm à l'isolement d'autres types d'EVs issues de différents échantillons biologiques complexes, les isolements d'EVs issues de cellules MCF-7 et de plasma sanguin ont été réalisés.

Les EVs MCF-7 ont été isolées selon le même protocole que celui utilisé ci-dessus dans le cadre de la lignée modèle THP-1. De la même façon, les différents échantillons issus des cellules MCF-7 (milieu biologique initial et les sorties collectées) ont été analysés par NTA. Les résultats sont présentés sur la *Figure 5.16*. Une fois l'échantillon trié en taille dans le système DLD D_c = 350 nm, la population des particules de taille inférieure à 350 nm est collectée dans les sorties non-déviées (*Figure 5.16c*, histogramme jaune) : on observe que les particules collectées ont effectivement une taille inférieure à 300 nm (*Figure 5.16a*). Par ailleurs, les particules de taille supérieure à 300 nm bien que peu présentes dans l'échantillon initial (*Figure 5.16a*, histogramme bleu marine), sont présentes uniquement dans la sortie déviée (*Figure 5.16b*, histogramme gris). Les débris cellulaires ont été isolés permettant de disposer d'échantillon d'EVs purifiées. Les EVs (50 à 300 nm) sont en effet collectées dans les sorties non-déviées du système tandis que les débris cellulaires sont déviés dans la sortie centrale.

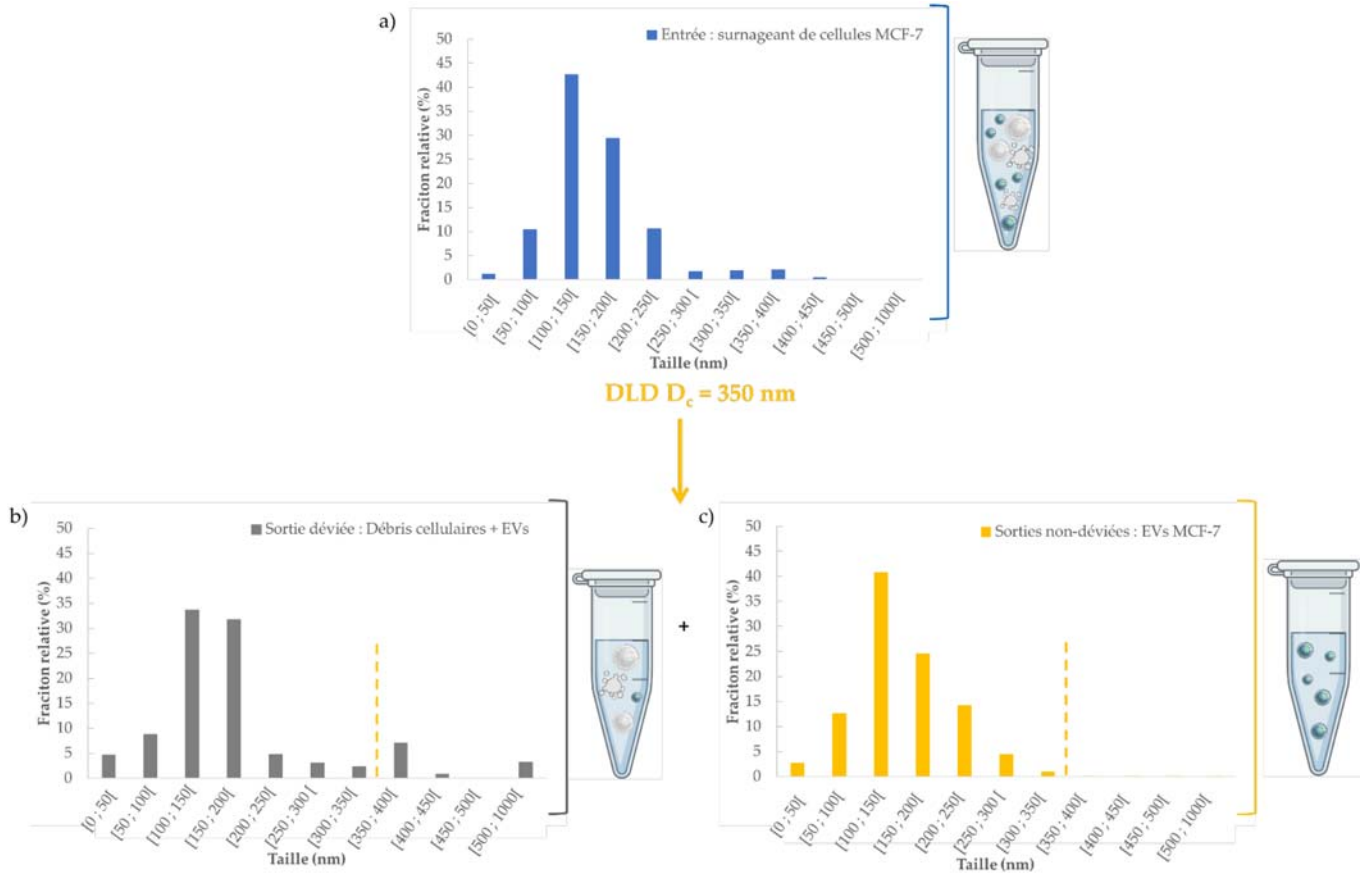


Figure 5.16 : Tri en taille d'EVs issues de cellules MCF-7 par le système DLD D_c = 350 nm à partir de surnageant de culture cellulaire. a) Histogramme du profil de taille du surnageant de cellules MCF-7 ; b) Histogramme du profil de taille des débris cellulaires et EVs collectés dans la sortie déviée ; c) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans les sorties non-déviées. Chaque condition représente trois expériences et chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 5 000 particules.

Ces résultats ont été obtenus en isolant des EVs issues de culture cellulaire de lignées. Bien que ce type d'échantillon soit largement utilisé comme modèle en biologie, il ne reflète pas entièrement la complexité d'un échantillon biologique issu d'une biopsie liquide tel que le sang.

3.c.iii. Isolement de vésicules extracellulaires issues de plasma sanguin, un échantillon biologique complexe

Ainsi, l'échantillon biologique complexe testé est le plasma issu d'échantillons sanguins collectés à l'EFS de Grenoble. Le passage du surnageant de milieu de culture à l'échantillon biologique utilisé en routine à l'hôpital a été un enjeu de taille pour démontrer l'intérêt du système microfluidique DLD.

Cinq échantillons de sang ont été collectés et mélangés afin d'éviter les biais potentiellement liés à un échantillon. Le plasma a été isolé par deux centrifugations successives à 2 500 g durant 15 minutes à température ambiante puis il a été dilué au dixième dans du DPBS et finalement filtré sur 1,2 µm. Suite à cette rapide préparation, l'échantillon biologique complexe a été injecté dans le système DLD D_c = 350 nm durant plusieurs heures à 4 bars. Les échantillons ont été caractérisés en taille et en concentration par NTA et les résultats associés sont présentés sur la *Figure 5.17*.

Figure 5.17 : Tri en taille d'EVs de plasma sanguin par le système DLD D_c = 350 nm. a) Histogramme du profil de taille du plasma sanguin filtré et dilué ; b) Histogramme du profil de taille des débris cellulaires et EVs collectés dans la sortie déviée ; c) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans les sorties non-déviées. Chaque condition représente trois expériences et chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 5 000 particules.

Une fois l'échantillon trié en taille dans le système DLD D_c = 350 nm, la population des particules de taille inférieure à 350 nm est collectée dans les sorties non-déviées (*Figure 5.17c*, histogramme rose). En effet, la proportion relative de l'histogramme rose s'étend de 50 à 300 nm et très peu de particules ont une taille supérieure à 300 nm (*Figure 5.17c*). Les particules supérieures à 300 nm, extrêmement peu représentées dans l'échantillon initial (*Figure 5.17a*, histogramme bleu marine), sont présentes dans la sortie déviée (*Figure 5.17b*, histogramme gris). Les EVs sont collectées, comme attendu, dans les sorties non-déviées

mais les échantillons présentant peu de débris cellulaires la pertinence du tri devient finalement caduque. Tout de même, le système fluidique permet de traiter des échantillons tels que du plasma dilué au dixième ce qui est très encourageant quant au transfert du dispositif au chevet du patient. De plus, les EVs ont plutôt une taille inférieure à 200 nm dans ces échantillons de plasma sanguin à la différence des EVs issues de culture cellulaire. Ainsi, il serait pertinent de prévoir un nouveau *design* pour les échantillons de plasma avec un D_c plus ajusté. En effet, il avait été défini à 350 nm du fait de la précision à +/- 50 nm de ces systèmes pour l'isolement de particules nanométriques. Cependant, après évaluation de l'isolement d'EVs issues de plasma, cela semblerait pertinent de définir un D_c à 200 nm pour la suite du développement du système microfluidique.

4. Le système DLD nano-ciblé D_c = 140 nm : vers le fractionnement de sous-populations de vésicules extracellulaires

Un second dispositif DLD nano-ciblé a été développé pour fractionner une population d'EVs en sous-populations de différentes tailles.

4.a. Dispositif analytique DLD nano-ciblé D_c = 140 nm

En développant les dispositifs DLD nano-ciblés, deux D_c ont été retenus pour l'application au tri des EVs. Le second est un système ayant un D_c = 140 nm avec une géométrie où le diamètre des piliers et l'espace interpiliers est de 1,5 µm. Ce D_c permettant théoriquement de trier les échantillons biologiques autour de 140 nm peut être intéressant afin d'isoler des sous-populations d'EVs par leur taille à partir d'un échantillon d'EVs de plasma par exemple. La *Figure 5.18* représente un profil de distribution en taille typique des EVs de plasma isolées par centrifugation différentielle. Il montre que l'échantillon d'EVs dispose de plusieurs sous-populations.

D'après l'ISEV, les exosomes, une des classes d'EVs très intéressante pour son potentiel de biomarqueur doivent répondre à plusieurs critères pour être considérés comme tels[3]. L'un d'eux est basé sur la taille, ils s'établissent entre 50 et 150 nm. Le fractionnement d'un échantillon d'EVs est envisagé par le système DLD nano-ciblé D_c = 140 nm en vue de l'établissement de différentes sous-populations pour isoler les exosomes.

Figure 5.18 : Profil de distribution en taille et en concentration obtenu par NTA d'un échantillon d'EVs issues d'un échantillon de plasma sanguin.

Si fractionner un échantillon d'EVs est possible, alors plusieurs questions peuvent émerger : les sous-populations en taille d'EVs expriment-elles les mêmes protéines constitutives ? Serait-il pertinent de fractionner les EVs en sous-populations en termes d'approche diagnostique ?

4.b. Calibration du système de fractionnement par des particules modèles

L'étude approfondie du tri en taille de particules modèles dans ce système a tout d'abord été réalisée. Tout comme pour le système DLD D_c = 350 nm, la vérification du D_c théorique a été réalisée par l'utilisation de billes de polystyrène rigides, fluorescentes et de tailles calibrées. Ensuite, la calibration du système par des particules modèles souples a été envisagée afin de se rapprocher des EVs.

4.b.i. Billes modèles

Afin de valider le D_c théorique établi lors de la conception des composants DLD nano-ciblés, deux tailles de billes de polystyrène fluorescentes (Red et Green Fluoromax®) sont choisies respectivement à 100 et 200 nm. Indépendamment, elles sont injectées dans le dispositif DLD D_c = 140 nm. Chaque solution de billes est réalisée dans du PBS + 1% Tween 20 (billes 200 nm : concentration à 10^{10} particules/mL ; billes 100 nm : concentration à 10^{11} particules/mL). La concentration en particules a été fixée comme concentration minimale permettant de détecter les particules avant et après le tri DLD avec le lecteur de microplaques à fluorescence (Infinite® M1000, **TECAN**). Ces deux échantillons ont été injectés indépendamment dans le canal DLD à 2 bars, et les expériences de tri ont été réalisées à 4 bars, en utilisant le même conditionnement fluidique à haute pression que celui présenté précédemment. Les expériences ont été menées durant environ 8 heures de façon à collecter environ 15 µL en sortie déviée. Pour rappel, le débit de ce système DLD nano-ciblé est de l'ordre de 48 µL/h à 4 bars mais seulement 7% du flux est collecté dans la sortie déviée.

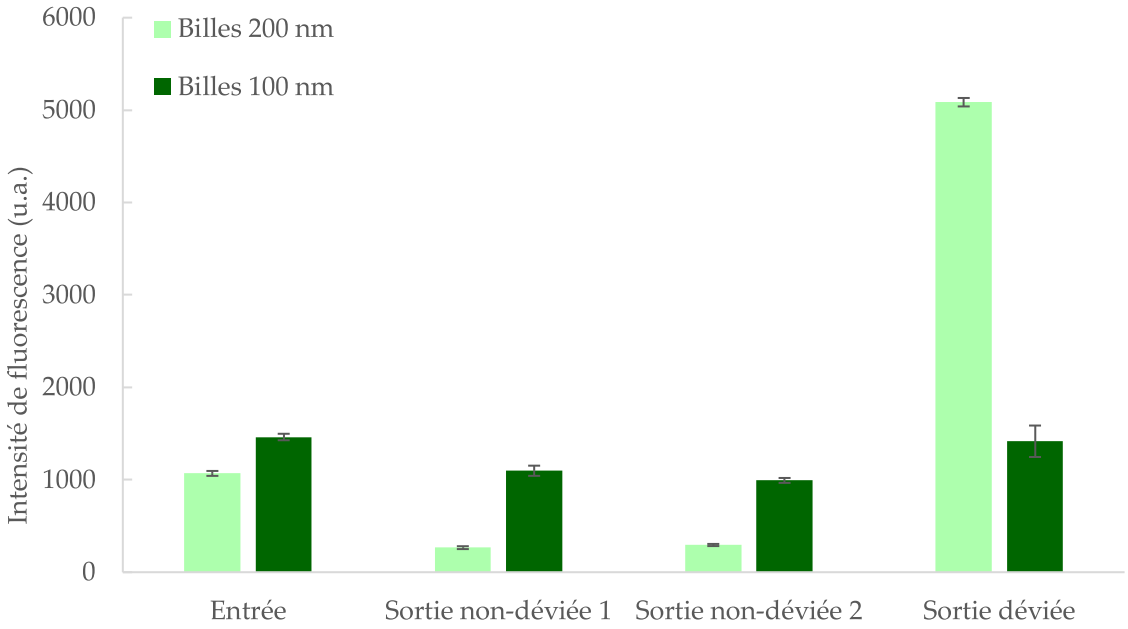


Figure 5.19 : Tri en taille de billes de 100 et 200 nm par le système DLD D_c = 140 nm. Intensités de fluorescence du mélange de billes (100 et 200 nm) mesurées aux différentes longueurs d'onde d'intérêt à l'entrée et dans les différentes sorties. Chaque condition représente un total de trois valeurs.

Les résultats de fluorescence pour les deux tailles de billes sont présentés sur la *Figure 5.19*. Cet histogramme illustre la fluorescence similaire obtenue pour les billes de 100 nm collectées dans la sortie déviée et les sorties non-déviées. Il montre que les billes de 100 nm ont circulé dans le canal DLD sans être déviées, comme attendu dans ce dispositif avec leur taille inférieure au D_c. En ce qui concerne les billes de 200 nm, cet histogramme montre que la fluorescence de l'échantillon collecté dans la sortie centrale est presque cinq fois plus intense que l'échantillon injecté. Les résultats préliminaires indiquent que les billes de 200 nm ont été déviées le long du réseau DLD et sont principalement collectées dans la sortie déviée. Même s'il n'est pas quantitatif, ce résultat suggère le tri sélectif des billes de 200 nm par rapport aux billes de 100 nm dans le réseau DLD D_c =140 nm. Ce résultat semble donc valider la fonctionnalité du système DLD D_c = 140 nm.

Cependant, ces expériences sont un peu délicates à réaliser car les billes nanométriques doivent être suffisamment concentrées pour être détectables avec le lecteur de microplaques à fluorescence (plus les billes sont petites, moins leur fluorescence est intense et plus leur concentration doit être élevée pour être détectée), mais une concentration trop élevée de billes (de l'ordre de 10^{11} particules/mL par exemple) pourrait conduire à une obstruction partielle et progressive du canal DLD. De plus, bien que ces expériences aient été reproduites indépendamment trois fois, un manque de reproductibilité a pu être mis en évidence. En effet, la déviation des billes de 200 nm n'a pas été systématiquement observée et ceci en partant de la même solution mère de billes et en diluant selon le même facteur de dilution. Des interrogations quant au colmatage se posent. En effet, si le réseau DLD venait à se boucher partiellement, une perturbation du flux pourrait avoir lieu et aboutirait à une mauvaise séparation des billes en taille. Actuellement, des solutions alternatives comme l'utilisation de billes non fluorescentes pour analyse des

échantillons collectés en sorties par NTA notamment sont envisagées afin de pouvoir injecter une solution de billes nanométriques peu concentrée tout en étant capable de détecter ces objets en sortie du dispositif.

En conclusion sur le tri DLD des particules avec D_c = 140 nm, les résultats préliminaires de tri sont prometteurs, mais doivent être consolidés. La difficulté de caractérisation de telles nanoparticules doit également être soulignée, car les outils de caractérisation dédiés aux nanoparticules dont nous disposons ne permettent généralement pas la quantification d'échantillons peu concentrés.

4.b.ii. Fractionnement de sous-populations de vésicules extracellulaires

Face à ces résultats prometteurs mais fragiles, quelques expériences sur des modèles biologiques à membrane souple ont été réalisés. Le tri d'EVs issues d'un échantillon de plasma a été mené dans le dispositif DLD D_c = 140 nm. Cinq échantillons de sang total ont été commandés à l'EFS de Grenoble et assemblés. Deux centrifugations de 2 500 g ont été réalisées afin de récupérer le plasma. Finalement, le plasma a été dilué au dixième dans du PBS, filtré sur 0,45 µm et a été injecté dans le système DLD D_c = 140 nm à 4 bars durant 8 heures. Les échantillons des différentes sorties ont été analysés par NTA.

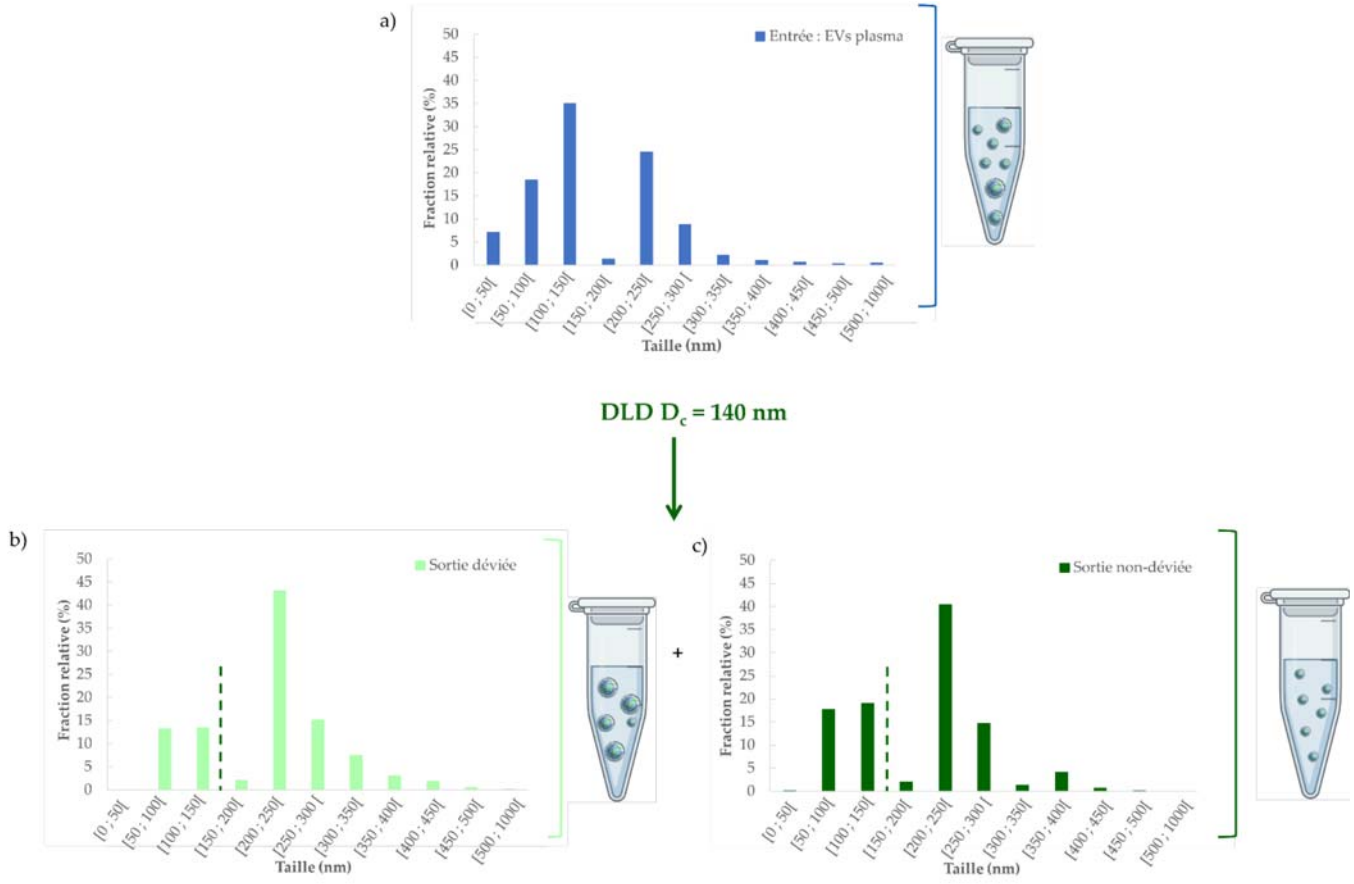


Figure 5.20 : Tri en taille d'EVs de plasma sanguin, préalablement isolées par UC, par le système DLD D_c = 1400 nm. a) Histogramme du profil de taille du plasma sanguin filtré et dilué ; b) Histogramme du profil de taille des débris cellulaires et EVs collectés dans la sortie déviée ; c) Histogramme du profil de taille des EVs collectées dans les sorties non-déviées. Chaque condition représente une expérience mais chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 2 000 particules.

D'après la *Figure 5.20* où sont représentées la courbe d'EVs issues de plasma ainsi que les proportions relatives en fonction de la taille des différentes sorties, aucun enrichissement en particules de taille

supérieure à 140 nm n'a été observée en sortie centrale : les profils des populations collectées dans la sortie déviée et les sorties non-déviées sont très similaires. De plus, des particules de taille supérieure à 140 nm ont été collectées dans les sorties latérales. En effet, la population de l'histogramme vert foncé s'établit entre 50 et 450 nm. Si un tri en taille était observé, l'histogramme vert foncé serait restreint au-delà de 140 nm. Les profils des échantillons collectés dans les différentes sorties sont relativement similaires à l'échantillon d'entrée, ceci pourrait être dû à une saturation du réseau de piliers bien que la concentration d'EVs injectée dans le système soit relativement faible (10^8 EVs/mL) par rapport aux concentrations physiologiques des EVs dans les fluides biologiques (de l'ordre de 10^{12} EVs/mL). Diluer l'échantillon d'entrée aiderait certainement à séparer plus finement les sous-populations d'EVs mais aussi à limiter les problèmes de bouchage supposé.

Pour conclure, seulement quelques expériences ont été réalisées avec des modèles biologiques dans le dispositif DLD nano-ciblé D_c =140 nm mais aucune d'entre elles n'a pu démontrer le fractionnement en sous-poulations d'EVs mesurant entre 50 et 300 nm.

Au vu du temps imparti par la thèse, cet axe n'a pas été privilégié mais mériterait effectivement d'être retravaillé et approfondi afin de comprendre pourquoi les billes de 200 nm ont pu être déviées dans le système mais pas les particules biologiques à membrane souple. L'hypothèse la plus probable est qu'une concentration de travail est à déterminer afin d'éviter un bouchage prématuré du système. De plus, un système fluidique permettant de travailler à une pression d'injection supérieure à 5 bars pourrait augmenter la vitesse des particules dans le canal et limiterait le bouchage. Cependant, travailler à des concentrations faibles est difficilement compatible avec les outils de caractérisations nanométriques à disposition. Un véritable enjeu de caractérisation est ainsi à prendre en compte pour mener à bien le fractionnement de sous-populations d'EVs par DLD à l'avenir.

5. Développement d'un système DLD automatisé

Actuellement, les cartes fluidiques du dispositif DLD nano-ciblé sont vissées (*Figure 5.5*) et leur montage requiert une certaine expérience. Dans l'objectif de pouvoir interagir avec des partenaires, une simplification d'utilisation du système est nécessaire. Pratiquement, le montage vissé DLD nano-ciblé prend environ 30 minutes pour un utilisateur expérimenté à mettre en œuvre tandis que le montage aimanté DLD micro-ciblé requiert environ 5 minutes à l'utilisateur. Par ailleurs, un pilotage à une pression supérieure à 4 bars permet aussi d'augmenter l'advection des plus petites particules et augmente le débit. La durée d'analyse peut être réduite ou le volume traité peut être plus important.

Le développement d'un automate pour l'utilisation d'un montage aimanté compatible avec la haute pression appliquée dans le système DLD nano-ciblé a été réalisé (*Figure 5.21b et c*). L'automate comprend une caméra permettant de suivre l'écoulement à travers le réseau DLD, une mâchoire de pression permettant d'assurer l'étanchéité de la carte fluidique jusqu'à 6 bars et diverses arrivées de connectiques permettant notamment l'arrivée de l'air comprimé (*Figure 5.21a*). Un autre avantage d'utilisation de cet automate est la possibilité d'augmenter la pression d'injection du fluide dans le réseau DLD. Ainsi, en augmentant la pression d'injection, le débit traité augmente sans avoir à paralléliser les réseaux DLD. De nouveaux types de joints silicone sont actuellement à l'étude pour permettre l'étanchéité de la carte fluidique à une pression supérieure à 6 bars.

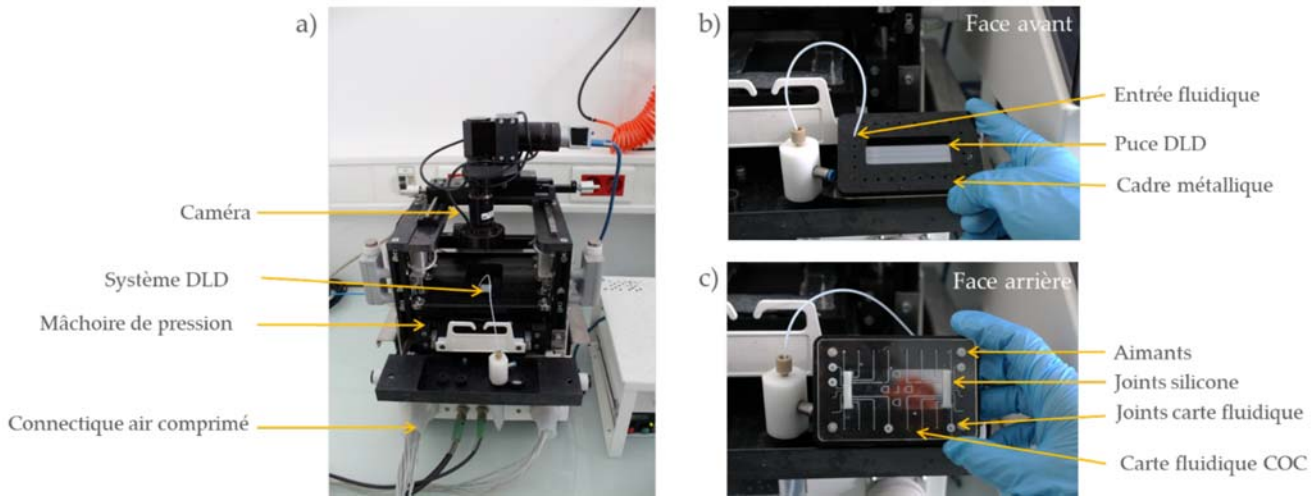


Figure 5.21 : Dispositifs DLD nano-ciblé avec l'intégration fluidique dans l'automate ; a) Automate DLD haute pression : une mâchoire de pression permet l'utilisation de la carte fluidique aimantée jusqu'à 5 bars ; b) et c) Carte fluidique aimantée compatible avec la haute pression (faces avant et arrière).

6. Conclusions et Perspectives

Ce chapitre a permis de présenter le développement d'une stratégie originale d'isolement d'EVs à partir de milieu biologique complexe basée sur le principe de DLD. Cette méthode est relativement simple à mettre en œuvre pour l'utilisateur (bien qu'elle demande un peu d'expérience) et un effort de simplification est encore en cours *via* le développement de l'automate DLD. Les systèmes DLD nano-ciblés ont été développés après un travail d'optimisation du *design* et des résistances hydrauliques de façon à obtenir un système nano-ciblé avec des débits et des durées d'analyses compatibles avec les attentes des utilisateurs. Le système DLD D_c = 350 nm a notamment permis de démontrer l'isolement d'EVs à partir de surnageant de culture cellulaire de THP-1 et MCF-7 sur la base d'un tri en taille. Les EVs obtenues sont similaires d'après l'analyse NTA à celles isolées par la méthode de référence mais le système DLD a un avantage indéniable : celui d'être non-destructif pour l'échantillon. En effet, les images de TEM ont montré que les EVs isolées par DLD D_c = 350 nm sont intègres alors que celles isolées par UC ne le sont pas toutes.

La transposition à un échantillon biologique complexe a été réalisée *via* un échantillon de plasma sanguin. Cet échantillon s'est avéré pauvre en particules de taille supérieure à 300 nm et n'a pas permis de conclure à un enrichissement en débris cellulaires de l'échantillon dévié. Une nouvelle définition d'un D_c plus pertinent (200 nm) permettrait d'isoler les EVs issues d'un échantillon de plasma sanguin.

Des difficultés de reproductibilité pour le tri de particules modèles nanométriques faiblement concentrées et polydisperses sont apparues durant le développement du système DLD D_c = 140 nm. L'utilisation de billes non fluorescentes pour permettre une analyse NTA des échantillons collectés dans les différentes sorties pourrait permettre de diminuer la concentration de travail dans le système DLD D_c = 140 nm et ainsi limiter le bouchage supposé du réseau de piliers. De plus, l'utilisation du système NTA en mode « petits volumes » proposé par l'équipementier **Malvern Panalytical** devrait permettre d'analyser des échantillons de faible volume (50 µL environ) Finalement, de nouveaux systèmes de caractérisations nanométriques sont en cours de déploiement au CEA Leti et notamment les SNR, décrits au **chapitre 1**. Pour rappel, ces SNR consistent en des micro-leviers permettant d'analyser la fréquence associée à chaque

particule selon sa masse et applicables aux EVs[217]. Le banc microfluidique SNR n'est pas encore tout à fait opérationnel pour la caractérisation d'EVs au laboratoire mais les avancées prévues en 2021 et 2022 devraient permettre aux systèmes SNR de caractériser des particules biologiques. Ces caractérisations permettront de faciliter la compréhension du système DLD nano-ciblé D_c = 140 nm et *in fine,* de trier des sous-populations d'EVs sur le critère du tri en taille.

.

Résumé – Développement d'un système de tri microfluidique par DLD pour l'isolement de particules sub-micrométriques

- Les systèmes DLD nano-ciblés ont été conçus avec une géométrie micrométrique afin de pouvoir réaliser des outils disposant d'un débit intéressant pour l'application biologique. Deux D_c ont été retenus, l'un pour le tri d'EVs et l'autre pour le fractionnement de sous-populations, à partir d'échantillons complexes : 350 et 140 nm.

- La fabrication des DLD a été réussie avec des profondeurs de canaux et des densités de motifs importantes (AR = 20) de façon reproductible et standard. La résistivité fluidique liée aux DLD nano-ciblés a conduit au développement d'un système fluidique haute pression basé sur une carte plastique et un cadre aluminium vissé.

- L'isolement d'EVs issues de cellules THP-1 par le système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm a été démontré et comparé à la méthode standard d'UC par NTA et cryo-TEM. Des EVs, issues de cellules MCF-7 et de plasma, ont été isolées par cette nouvelle méthode permettant au système DLD D_c = 350 nm de se positionner comme une alternative à l'UC.

- Le développement d'un second système DLD nano-ciblé disposant d'un D_c de 140 nm a été réalisé et validé sur les billes de polystyrène. Cependant, le passage au tri d'échantillon biologique s'est avéré complexe et non-concluant. Des améliorations sur les caractérisations en taille des échantillons collectés en sortie du dispositif sont nécessaires afin de permettre une meilleure compréhension du système et *in fine* son fonctionnement.

- Finalement, le développement d'un automate DLD a été initié afin de permettre une intégration fluidique des composants DLD nano-ciblés plus simple et rapide. Cet automate permettra l'augmentation de la pression appliquée en entrée sur le fluide afin d'augmenter le débit et de diminuer le temps inhérent à l'expérience.

Chapitre 6 : Intégration d'aptamères dans le système DLD appliquée à l'isolement de vésicules extracellulaires d'intérêt

Chapitre 6 – Intégration d'aptamères dans le système DLD appliquée à l'isolement de vésicules extracellulaires d'intérêt – Évaluation des stratégies de chimie de surface sur silicium pour la fonctionnalisation d'oligonucléotides ADN

- Les éléments fondamentaux portant sur la fonctionnalisation de dispositif en silicium par les réactions de silanisation seront posés. Différentes méthodes peuvent être employées, en phase liquide, vapeur ou CO_2 supercritique.

- Les particularités de microfabrication des composants DLD seront abordées et permettront de redéfinir une stratégie de chimie de surface compatible avec ces systèmes. Un plan d'expérience sera élaboré afin de tester plusieurs silanes déposés soit en phase vapeur soit en phase CO_2 supercritique. La silanisation sera tout d'abord réalisée sur des substrats Si/SiO_2 plans puis les stratégies les plus prometteuses seront testées sur les dispositifs DLD.

- Finalement, dans l'objectif de développer un système DLD associant tri en taille et tri biomarqueur-spécifique multiplexe, une nouvelle stratégie de chimie de surface impliquant un silane photoactivable sera développée. La fonctionnalisation localisée des aptamères CD63 et EpCAM sera mise en œuvre. Le système complet DLD biomarqueur-spécifique sera évalué sur un échantillon modèle d'EVs MCF-7.

Dans les chapitres précédents, la validation successive de la capture des EVs par les aptamères a été réalisée au **chapitre 3** et le développement du tri en taille dans des systèmes microfluidiques DLD a été mis en œuvre aux **chapitres 4 et 5**. Dans ce chapitre, l'intégration d'aptamères dans le système de tri DLD sera exposée. Pour cela, différentes stratégies de chimie de surface seront présentées afin *in fine* de fonctionnaliser le composant DLD silicium par différentes sondes aptamères. La réaction de silanisation de substrats silicium sera présentée ainsi que les différentes phases pour y parvenir (liquide, vapeur, CO_2 supercritique). Un premier volet sera consacré à la fonctionnalisation en phase liquide de substrats silicium. Les difficultés liées à la fonctionnalisation de composants la méthode réonrienteront la méthode de fonctionnalisation en limitant les étapes réalisées en phase liquide. Pour cela, différentes méthodes de silanisation en phases vapeur et CO_2 supercritique (CO_2SC) seront envisagées et réalisées. Finalement, afin de permettre le multiplexage de sondes aptamères à l'intérieur d'un même système DLD, une stratégie de silane photoactivable déposé en phase vapeur sera développée pour localiser la sonde aptamère dans le canal DLD. Cette stratégie semble particulièrement intéressante et permettra de faire une première preuve de principe du système DLD comme un système de tri, en taille, et en fonction des biomarqueurs à la surface des EVs.

Ce chapitre n'a pas été réalisé de manière linéaire durant la thèse. Différentes réorientations ont eu lieu et les séquences d'aptamères (CD63-1 et EpCAM) utilisées au début et à la fin du chapitre ont été remplacées par des séquences modèles (dénommées P2A) plus facilement disponibles au laboratoire. Cependant, les fonctions réactives mises en jeu sont les mêmes et cela n'influence pas les résultats décrits. Le développement de la stratégie de chimie photoactivable a été par ailleurs réalisé dans le cadre du stage de master 2 de Lena Bazin et a permis une avancée considérable sur ce volet du projet de recherche.

Dans ce chapitre, différents substrats en silicium ont été utilisés. La *Figure 6.1* récapitule les substrats utilisés ainsi que les dénominations associées.

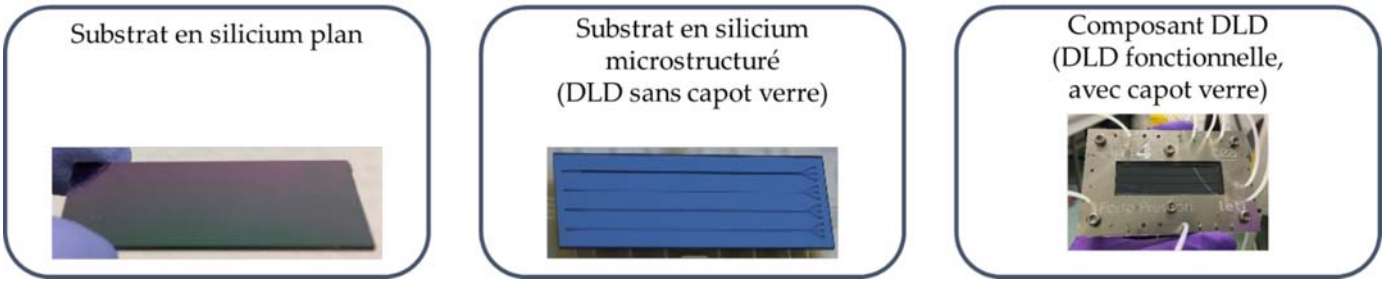
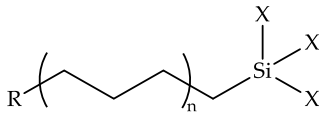


Figure 6.1 : Substrats en silicium utilisés dans le chapitre 6.

1. Différentes méthodes de silanisation

Pour fonctionnaliser le silicium par un aptamère par exemple, il est nécessaire de silaniser la surface. Le silane est un lien entre le substrat silicium et l'aptamère. La silanisation est un processus de fonctionnalisation par réaction chimique entre un silane (chlorosilane ou alcoxysilane) et les groupements hydroxyles d'un substrat (Si/SiO_2 notamment) formant une liaison covalente stable. Les substrats d'intérêt dans le cadre de cette étude seront des substrats en silicium microstructurés par le réseau DLD recouverts d'une couche d'oxyde de silicium (100 nm). Tandis que les silanes utilisés sont des molécules à base de silicium avec différents groupements organiques (*Figure 6.2*), des groupements hydrolysables (éthoxy et

méthoxy dans notre cas) et une chaine hydrogénocarbonée plus ou moins longue terminée par une fonction chimique. Ces silanes sont communément dénommés organosilanes.



R = groupement organique X = groupement hydrolysable (EtO, MeO ...)

Figure 6.2 : Structure chimique d'un organosilane.

1.a. Hydroxylation

Avant de réaliser ce procédé sur silicium, il est essentiel d'activer la surface. L'hydroxylation de la surface d'oxyde de silicium est une étape préliminaire clé avant le processus de silanisation pour avoir des fonctions silanols (Si-OH) à la surface (*Figure 6.3*). Cette étape d'activation peut également avoir une action de nettoyage des contaminants (particules, poussières, sels, composés organiques volatils …) adsorbés à la surface.

Figure 6.3 : Hydroxylation de la surface d'oxyde de silicium.

Bien que cette activation de surface puisse être réalisée en phase liquide (Piranha notamment mais également dans un mélange d'éthanol et de soude), cette étape utilise une grande quantité de produits chimiques et d'eau. Ainsi, la technique la plus couramment utilisée est le traitement par plasma d'oxygène. Il permet à la fois de nettoyer la surface des composés organiques volatils adsorbés mais aussi d'activer la surface d'oxyde de silicium. Le plasma est un état de la matière similaire à un gaz contenant des espèces chargées et neutres (ions et des électrons notamment). La modification de surface est principalement due à l'interaction des espèces actives de la phase gazeuse avec le substrat. Le procédé précis des interactions entre le plasma et la surface est complexe et ne sera pas détaillé ici. Typiquement, l'étape d'activation par plasma O_2 classique, se déroule dans les conditions suivantes : 20-500 cm^3/min de flux d'oxygène avec une puissance de 200 à 600 watts durant quelques minutes. Cette étape est importante car la quantité de fonctions silanols générées et disponibles permettra de réaliser des procédés de silanisation plus efficaces, en voie sèche ou humide. Le procédé le plus simple d'utilisation est le *dip-coating* (dépôt par trempage) en phase liquide.

1.b. Méthode standard de silanisation du silicium en phase liquide

Le trempage de substrats silicium dans des solvants organiques classiques est la méthode la plus facile pour effectuer des fonctionnalisations de substrats silicium microstructurés en phase liquide. En règle

générale, le silane est mélangé à un solvant organique sous atmosphère inerte, de façon à éviter l'hydrolyse des groupements hydrolysables. L'hydrolyse de ces groupements doit se réaliser à la surface sinon ils peuvent polymériser dans la solution, s'agréger. Dans la plupart des cas, ce phénomène est indésirable et l'objectif est d'obtenir une couche la plus homogène possible. Le substrat est incubé dans le mélange, agité durant le temps de réaction adéquat, puis lavé (acétone ou éthanol) et séché dans un four afin d'obtenir un substrat fonctionnalisé. Les solvants organiques utilisés sont des solvants anhydres comme le toluène ou le tétrahydrofurane.

Cette réaction de silanisation induit un déplacement des groupements nucléophiles (X) par les groupements hydroxyles présents à la surface du substrat (*Figure 6.4*). Afin d'assurer un lien covalent entre la surface et le silane et prévenir la polymérisation des silanes, une étape de séchage permet de déshydrater la surface et est réalisée à environ 150°C durant plusieurs heures afin de garantir la silanisation sous forme de fines couches de silane. La réaction de silanisation sur substrat silicium peut être étudiée par AFM[396] (suivi de la rugosité de surface), par mesure de l'angle de contact[397] (suivi de l'hydrophilicité de la surface), XPS ou encore IR.

Figure 6.4 : Dépôt de silane.

1.c. Phase vapeur

Cependant l'utilisation de volumes importants de solvants organiques et d'eau de rinçage pose des contraintes économiques et environnementales pour traiter ces effluents. Pour pallier ces différents problèmes, l'une des solutions envisagées dans la littérature est l'utilisation de phase vapeur et de fluide supercritique. De plus, les phases vapeur et supercritique permettent théoriquement une meilleure diffusivité des réactifs et peuvent permettre de fonctionnaliser plus facilement des dispositifs silicium complexes.

Les substrats silicium peuvent aussi être fonctionnalisés par des silanes grâce à des méthodes en phase vapeur où la quantité d'eau est parfaitement contrôlée. Un avantage indéniable de cette méthode est l'utilisation d'une quantité de solvant minimale. Les substrats silicium sont placés dans une chambre étanche et les molécules de silane sont vaporisées et diffusées ; elles réagissent librement avec les

groupements hydroxyles disponibles sur la surface d'oxyde de silicium[398] activée (*Figure 6.5*). Ce procédé, hautement reproductible, favorise la formation de fines couches de silane[399], la diffusion du silane et augmente intrinsèquement sa vitesse de réaction. Ainsi, les modifications de surface sont plus homogènes sur les substrats silicium. Cependant, la phase vapeur est limitée à l'utilisation de silane vaporisable, c'est-à-dire ayant une pression de vapeur inférieure à 6 mbars et disposant d'une température de vaporisation inférieure à 100°C. Les silanes disposant d'une fonction amine en position terminale sont déposés relativement plus rapidement (typiquement 1 heure) tandis que la silanisation d'autres silanes (époxyde, aldéhyde …) peut prendre jusqu'à 24 heures. Cette différence s'explique par la présence de la fonction amine terminale, basique, qui agit comme catalyseur de l'hydrolyse des groupements hydrolysables.

Figure 6.5 : Schéma de l'équipement pour la silanisation en phase vapeur, adapté de Nonglaton et al.[400].

1.d. Phase supercritique

L'état supercritique d'un fluide est atteint lorsque les conditions de température et de pression de celui-ci dépassent les températures et pressions critiques (point critique). Dans cette région, les phases liquide et gaz sont impossibles à distinguer. La *Figure 6.6* présente le diagramme de phase du CO_2. Ce diagramme montre l'existence de l'état supercritique lorsque l'on dépasse une température de 31,3°C et une pression de 72,9 bars pour le CO_2. La masse volumique d'un composé moléculaire varie en fonction de la température et de la pression. L'utilisation d'un fluide supercritique (comme le CO_2) en tant que solvant a plusieurs particularités intéressantes pour la silanisation. En effet, la masse volumique étant reliée à la solubilité, le CO_2 supercritique (CO_2SC) pourrait solubiliser plusieurs molécules en changeant uniquement les valeurs de température et de pression.

Figure 6.6 : Diagramme de phase du CO_2[401].

En état supercritique, ce gaz possède une densité proche de celle des solvants, avec une tension de surface nulle, une faible viscosité et une haute diffusion. Cette dernière est dix fois plus importante que celle des solvants organiques[402]. Ces propriétés vont être essentielles pour la fonctionnalisation des surfaces silicium puisqu'un tel solvant va améliorer la diffusivité des molécules jusqu'à la surface augmentant les chances d'obtenir un greffage homogène[403].

Ces propriétés physicochimiques font du CO_2SC un solvant prometteur pour les fonctionnalisations de surface des silices. Le CO_2SC est un solvant apolaire aprotique. Ceci conduit à une faible solubilité dans l'eau et à une forte solubilité dans les solvants organiques (toluène, éthanol, acétone). Les alcoxysilanes présentant une faible polarité sont quant à eux, solubles dans les solvants organiques traduisant leur compatibilité avec le processus de silanisation par CO_2SC. Le procédé consiste à déposer les substrats ainsi que le silane d'intérêt dans une chambre étanche. La pression et la température adéquates sont atteintes de façon à injecter du CO_2 sous la forme supercritique. La solubilisation du silane a lieu et le dépôt se fait de façon homogène sur les substrats. Le dispositif est schématisé sur la *Figure 6.7*.

Figure 6.7 : Dispositif pour la silanisation par CO_2SC, adapté du manuscrit de thèse de Clémentine Darpentigny[404].

Deux équipements sont disponibles dans une salle blanche du CEA Leti dédiée à la chimie de surface et permettent d'effectuer les silanisations en phases vapeur et CO_2SC. Ces équipements sont présentés sur la *Figure 6.8*.

Figure 6.8 : Équipements disponibles au CEA Leti ; a) Ecocoat 1224p YES pour la silanisation en phase vapeur ; b) SFD-200 SEPAREX pour la silanisation en CO_2SC.

Dans le cas de dépôt en phase vapeur, les substrats sont placés dans une chambre étanche, le silane d'intérêt est vaporisé préalablement et injecté dans la chambre durant le temps de réaction à une température donnée. Pour la silanisation par CO_2SC, le substrat et le silane sont déposés dans la chambre. Le CO_2 sous forme liquide subit une augmentation de pression et de température de façon à être sous forme supercritique dans la chambre et il permet ainsi la solubilisation du silane et son dépôt sur les substrats silicium. Les fonctionnements des équipements phase vapeur Ecocoat et CO_2SC SFD-200 sont schématisés (*Figure 6.5* et *Figure 6.7*).

2. Fonctionnalisation en phase liquide pour le greffage d'oligonucléotides ADN sur substrats en silicium

La stratégie de silanisation de substrats en silicium en phase liquide est l'approche la plus simple à mettre en œuvre au laboratoire, et ce à la fois pour les substrats en silicium plans, utilisés comme modèles, que pour les composants DLD microstructurées. Cette approche est envisagée dans un premier temps avec une chimie APTES en solvant organique puis dans un second temps avec une chimie carboxyéthylsilanetriol en phase aqueuse pour se rapporcher des conditions finales de fonctionnalisations des composants DLD.

2.a. Stratégie chimique par l'APTES en phase liquide pour la fonctionnalisation de substrats en silicium plans

L'APTES ((3-aminopropyl)triéthoxysilane) est un des silanes les plus connus et utilisés pour la fonctionnalisation de substrats silicium. Ce silane dispose d'une fonction amine primaire terminale, largement employée pour le greffage de biomolécules[405]. Cette silanisation est décrite de nombreuses fois et a récemment été optimisée pour des applications d'immobilisation de biomolécules post-silanisation[406]. Dans un objectif d'appréhender la chimie de surface de manière simple, cette silanisation sur substrats Si/SiO_2 plans a été réalisée.

Brièvement, les substrats silicium recouverts d'une couche d'oxyde de silicium de 100 nm sont réactivés par plasma (O_2/Argon ; 0,6 mbar ; 3 min ; 40 W ; **Diener Electronic**). Une solution de 2,5% (v : v) d'APTES est préparée dans le toluène anhydre. Les substrats silicium sont plongés dans la solution durant 5 heures à température ambiante et placés dans une chambre sèche (cristaux de calcium) pour assurer l'absence d'humidité. Les substrats sont ensuite rincés successivement au toluène, à l'éthanol puis à l'eau distillée et enfin séchés à l'air comprimé. Une étape de recuit à 110°C durant 1 heure est finalement réalisée. La silanisation par l'APTES d'un substrat Si/SiO_2 est schématisée sur la *Figure 6.9*.

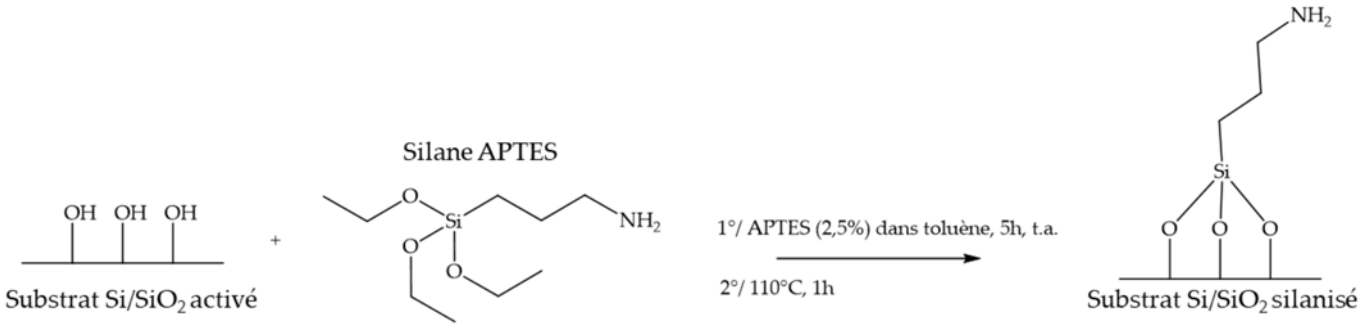


Figure 6.9 : Silanisation par l'APTES d'un substrat Si/SiO_2.

Les séquences d'aptamères CD63-1 et EpCAM ont été modifiées en 5' avec une fonction amine. Ainsi, une molécule *cross-linker* est nécessairement ajoutée afin de faire le pont entre l'amine libre en surface du substrat après silanisation par l'APTES et l'amine en 5' des aptamères. Le *cross-linker* choisi est le glutaraldéhyde permettant une modification du substrat par l'ajout d'une fonction aldéhyde libre capable *in fine* de réagir avec l'amine libre de l'aptamère. Cette étape est réalisée par incubation des substrats dans une solution 2,5% de glutaraldéhyde (v : v) dans l'eau durant 45 minutes à température ambiante et le lien imine est réduit à l'aide du borohydrure de sodium (100 mM) durant 45 minutes à température ambiante (*Figure 6.10a*). Après rinçage à l'eau, l'aptamère-NH_2 est greffé à la surface du substrat durant une nuit puis le second lien imine instable porté par la base de Schiff (composé organique avec une amine secondaire) est réduit par l'action du borohydrure de sodium dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (*Figure 6.10b*). Le mécanime de formation de l'imine formée est synthétisé (*Figure 6.10c*).

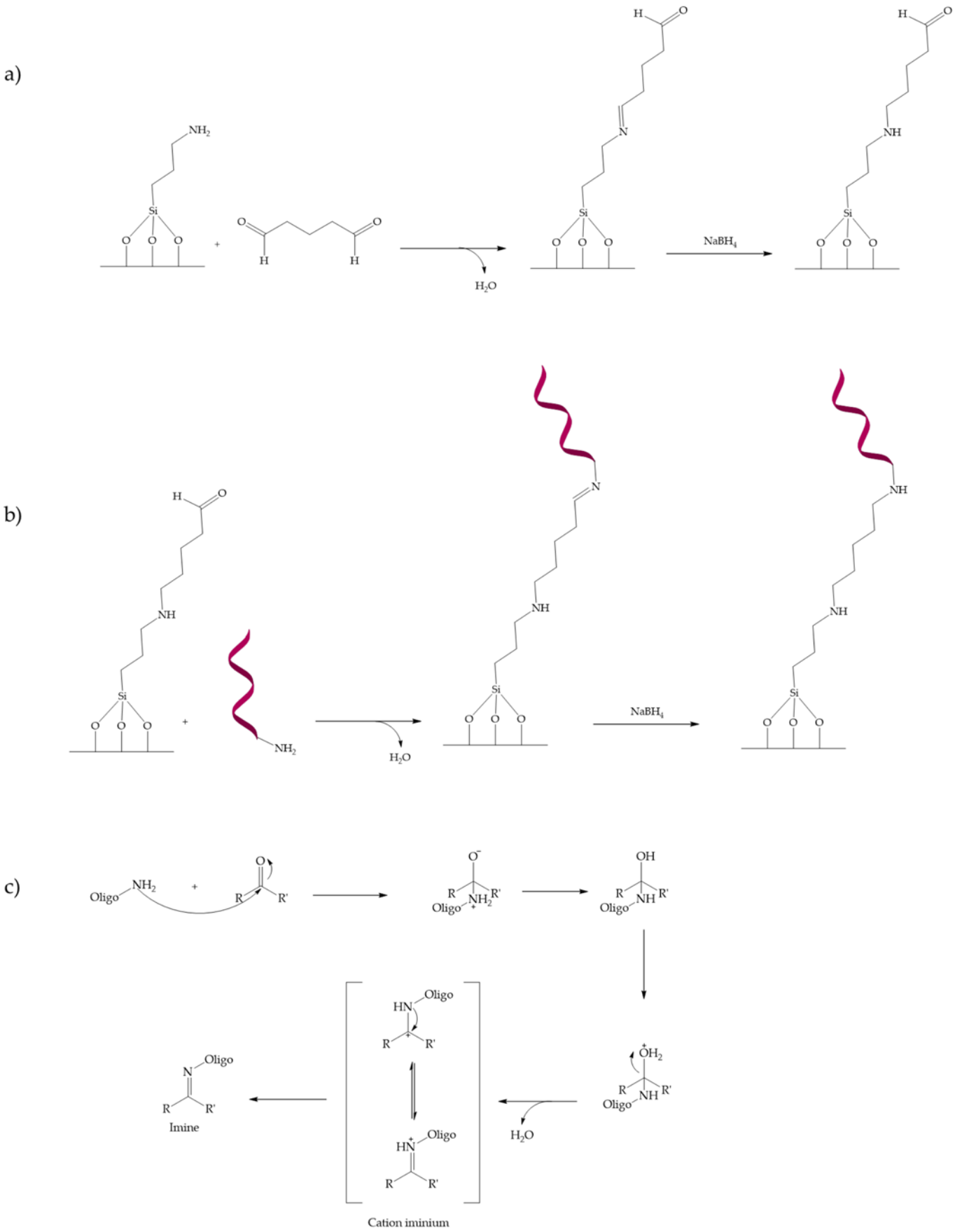


Figure 6.10 : Greffage d'oligonucléotides ADN sur un substrat Si/SiO2 fonctionnalisé par l'APTES par l'intermédiaire du glutardaldéhyde ; a) étape de greffage du glutardaldéhyde ; b) étape de greffage de l'oligonucléotide ; c) mécanisme détaillé de la formation de l'imine.

La fonctionnalisation des aptamères est réalisée à l'aide d'un robot dispenseur automatique (**Scienion**) représenté sur la *Figure 6.11*. Des microgouttes (300 pL environ) sont dispensées sur la surface et permettent une localisation chimique des oligonucléotides sur les substrats selon des motifs préalablement définis.

Figure 6.11 : Robot dispenseur automatique de solutions de biomolécules pour le patterning de surface de substrats ; a) Dispositif complet ; b) Image des aiguilles de dispense ; c) Patterning par gouttes sur un substrat.

Finalement, afin d'évaluer la présence des séquences d'aptamères à la surface des substrats silicium, l'hybridation des séquences complémentaires (définies au **chapitre 4** et marquées PE ou FITC) est réalisée à 0,1 µM dans le tampon d'hybridation (PBS supplémenté de 400 mM NaCl ; 0,05% Tween 20 ; solution de Denhard 0,01X ; ADN sperme de saumon 3 µg/mL) dans une chambre humide chauffée à 40°C durant 15 minutes à l'abri de la lumière. Toutes ces étapes sont réalisées en bain. Les substrats silicium sont ensuite rincés abondamment avec du tampon de lavage (PBS supplémenté de 400 mM NaCl ; 0,05% Tween 20). Les plots d'aptamères sont observés au microscope à fluorescence (**Olympus**). Les différentes étapes de fonctionnalisation d'un substrat silicium sont résumées ci-dessous (*Figure 6.12*).

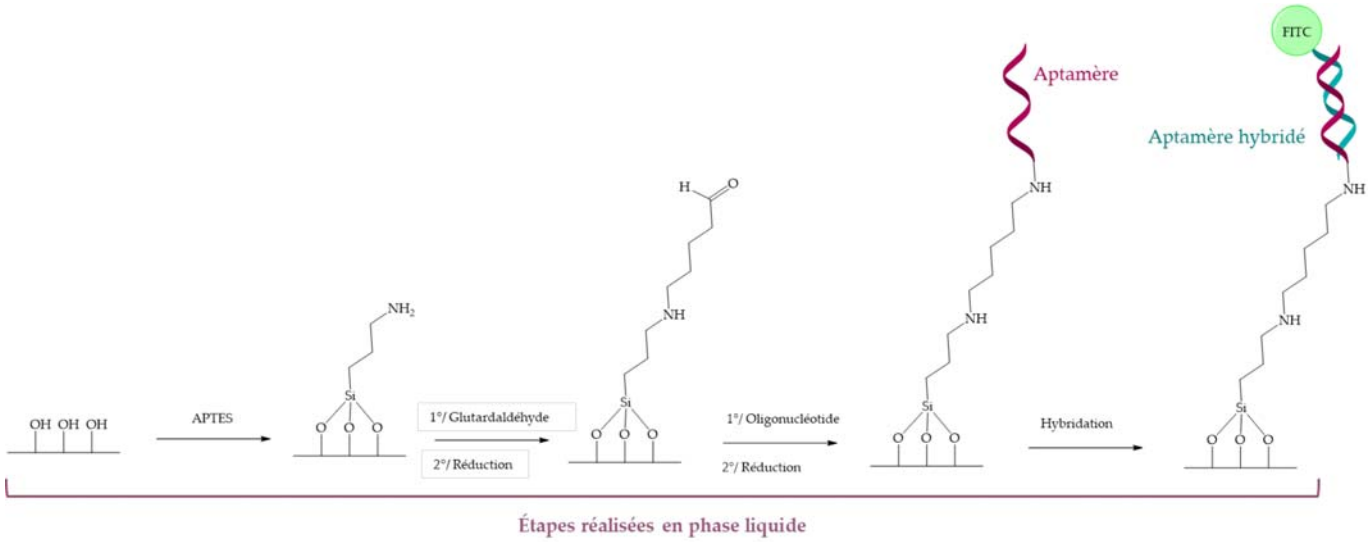


Figure 6.12 : Différentes étapes de fonctionnalisation d'un substrat silicium avec APTES comme silane et un oligonucléotide aminé pour la substitution nucléophile.

Les aptamères CD63-1 et EpCAM ainsi qu'une séquence d'oligonucléotides modèle Zip6 ont été ainsi greffés sur les substrats silicium plans. La séquence de l'aptamère CD63-2 n'était pas encore publiée lorsque ces expériences ont été réalisées en 2019. Deux séquences (dénommées c1 et c2) ont été conçues comme cibles complémentaires à chaque aptamère. Pour rappel, ces séquences ont des longueurs différentes comme cela a été montré au **chapitre 4**. Les hybridations ont été réalisées avec les séquences complémentaires courtes et longues de CD63-1 et EpCAM marquées avec la molécule fluorescente phycoérythrine (PE : $\lambda_{excitation}$ = 565 nm ; $\lambda_{émission}$ = 575 nm). Un contrôle positif a été réalisé par greffage d'une séquence modèle Zip6 et hybridation avec la séquence complémentaire correspondante. Un contrôle négatif d'hybridation du complémentaire CD63-1-c1 sur la séquence modèle Zip6 démontre la spécificité de chaque séquence complémentaire pour son aptamère correspondant.

Figure 6.13 : Images de fluorescence d'hybridations de séquences complémentaires aux aptamères CD63-1 et EpCAM greffés sur des substrats silicium plan par la chimie APTES, a) l'aptamère CD63-1 est greffé et révélé par les deux complémentaires court c1 et long c2 ; b) l'aptamère EpCAM est greffé et révélé par les deux complémentaires court c1 et long c2 ; c) l'oligonucléotide modèle Zip6 est greffé et hybridé avec son complémentaire sur l'image du haut et avec le complémentaire c1 de l'aptamère CD63-1 en bas. Toutes les images ont été réalisées au grossissement x10 avec le filtre fluorescent à la PE, avec un temps d'exposition de 0,04 s et un gain de 4.

Les résultats de fluorescence obtenus sont présentés sur la *Figure 6.13* et démontrent la fonctionnalisation des substrats silicium par les aptamères CD63-1 et EpCAM. De plus, la spécificité des séquences complémentaires est vérifiée par l'hybridation de CD63-1-c1 sur la séquence Zip6 qui ne montre aucun signal de fluorescence (*Figure 6.13c*). Ces images de fluorescence permettent uniquement une analyse qualitative de la fonctionnalisation et sont à comparer au contrôle négatif. En effet, elles ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique. Par la suite, les lectures de la fluorescence seront réalisées par un scanner de fluorescence permettant d'analyser les intensités de fluorescence de façon plus précise et quantitative.

Dans le **chapitre 4**, le principe de relargage des EVs par déplacement de l'équilibre d'affinité induit par l'ajout des séquences complémentaires aux aptamères a été amorcé par la démonstration de déplacement de brins de longueurs différentes sur les aptamères greffés sur des micro-billes. Il est rappelé sur la *Figure 6.14a*. Afin de vérifier que ce phénomène est aussi applicable dans le cadre d'aptamères greffés sur des substrats silicium, le même type de déplacement de brins complémentaires de longueurs différentes est initié. Dans le cadre de ce modèle sur substrat silicium, seul l'aptamère CD63-1 a été utilisé pour ces expériences. Après greffage de l'aptamère CD63-1 par silanisation APTES, la séquence courte complémentaire CD63-1-c1 marquée FITC est hybridée dans les conditions standard décrites ci-dessus. Après observation de la fluorescence au microscope (*Figure 6.14a*), la séquence longue complémentaire CD63-1-c2 marquée PE est hybridée à la surface du substrat durant 15 minutes à température ambiante. La fluorescence FITC est à nouveau observée au microscope (*Figure 6.14b*) et aucun signal n'est détecté. La fluorescence PE correspondant à la séquence complémentaire longue, d'affinité supérieure pour sa sonde, est observée et le signal est collecté (*Figure 6.14c*). Ceci démontre bien le déplacement du brin court complémentaire CD63-1-c1 marqué FITC favorisant le déplacement de l'équilibre d'affinité menant à l'hybridation du brin long complémentaire CD63-1-c2 marqué PE.

Figure 6.14 : a) Principe du déplacement de brins complémentaires d'affinités différentes suivi par lecture de fluorescence, notée F. b) c) d) Images de fluorescence de l'hybridation de séquence complémentaire courte CD63-1-c1 FITC suivie du déplacement de cette séquence par simple ajout de la séquence complémentaire longue CD63-1-c2 PE. Toutes les images ont été réalisées au grossissement x10 avec les cubes adéquats à la FITC et la PE, avec un temps d'exposition de 0,04 s et un gain de 4.

2.b. Stratégie chimique par le carboxyéthylsilanetriol en phase liquide pour la fonctionnalisation de composants DLD

La stratégie APTES en phase liquide pour la fonctionnalisation de substrats silicium plans par des oligonucléotides ADN s'effectue dans un solvant organique. Comme déjà annoncé précédemment, le système fluidique DLD est constitué d'un composant DLD en silicium intégré dans une carte plastique en COC. La grande majorité des solvants organiques classiques de silanisation ne sont pas compatibles avec les cartes fluidiques en COC. Une silanisation des composants DLD réalisable dans un milieu aqueux est envisagée. Un procédé a pour cela été établi depuis plusieurs années au CEA Leti. La fonctionnalisation en flux des composants DLD micro-ciblés a été assurée par le système fluidique dédié au système DLD mciro-ciblé.

Des particularités liées à la microfabrication sont importantes à rappeler afin de pouvoir envisager la suite de la fonctionnalisation chimique de composants DLD pour le greffage d'aptamères. En effet, les composants DLD sont constitués de réseaux de piliers gravés dans un substrat silicium et fermés par un capot verre (**chapitre 4**). De ce fait, les entrées fluidiques sont effectuées après le scellement du capot verre. Les conditions de scellement (scellement anodique et gravure profonde des entrées fluidiques soumises à des conditions chimiques très fortes : HF notamment) sont incompatibles avec la fonctionnalisation chimique et le greffage de biomolécules telles que les aptamères. Cette technologie d'assemblage ne permet pas d'envisager la fonctionnalisation de surface en cours de microfabrication. La fonctionnalisation est ainsi nécessairement réalisée en fin de fabrication, en flux.

Le silane carboxyéthylsilanetriol (*Figure 6.15*) disposant d'une fonction acide carboxylique est fonctionnalisé dans le composant après avoir fait une activation par plasma oxygène. Une solution de carboxyéthylsilanetriol est préparée dans l'eau à 25% (v : v) neutralisée avec 0,2 M d'acide chlorhydrique et est injectée dans le système DLD pendant une nuit. Durant la réaction, le dispositif DLD est placé dans une étuve à 50°C. Le système est ensuite rincé à l'eau et le composant est placé à 120°C durant 3 heures. Suite à cette étape de silanisation, le composant DLD est à nouveau placé dans le système fluidique DLD complet et le greffage d'oligonucléotides ADN est réalisé. Une solution de 10 µM d'oligonucléotide aminé (séquence modèle P2A : $^{5'}$CGGATACCCAAGGA$^{3'}$) avec 1,1 équivalent d'EDC (1-éthyl-3-(-3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) est injecté dans le composant DLD durant 2 heures à température ambiante. Dans ce cas, les pressiosn d'injection sont de l'ordre d'une centaine de millibars car les dispositifs DLD sont des composants disposant de dimensions géométriques d'une dizaine de micromètres. L'injection est relativement simple à réaliser et cela met en évidence le fait que ces étapes sont difficilement envisageables dans des composants DLD disposant de dimensions géométriques (piliers et espaces interpiliers) proches de 1 ou 2 µm. Le mécanisme réactionnel du couplage acide carboxylique – amine est présenté ci-dessous (*Figure 6.15*).

Figure 6.15 : Couplage acide carboxylique – amine

Des étapes de rinçage avec une solution 0,2% SDS et de l'eau sont réalisées. Finalement, l'hybridation de la séquence complémentaire (0,1 µM) à l'oligonucléotide P2A marqué Cy3 ($\lambda_{excitation}$ = 550 nm ; $\lambda_{émission}$ = 570 nm) est réalisée dans le tampon d'hybridation durant 2 heures à température ambiante puis rincée abondamment à l'eau. La fluorescence est lue à 570 nm par un scanner de fluorescence (LS Reloaded Scanner, **TECAN**). Les résultats de fluorescence sont présentés sur la *Figure 6.16*. Le canal DLD (D_c = 4 ; G = 11 µm) fonctionnalisé et hybridé (encadré en violet) ne présente pas de signal fluorescent significativement différent du contrôle négatif (canal non fonctionnalisé mais hybridé, encadré en gris).

Figure 6.16 : Image de fluorescence obtenue après greffage des oligonucléotides P2A hybridés à leurs complémentaires marqués Cy3 par fonctionnalisation avec le carboxyethylsilanetriol observée à 570 nm sur le scanner TECAN ; le canal DLD en violet correspondant à l'hybridation de la séquence P2A avec son complémentaire tandis que le canal DLD en gris n'a pas été fonctionnalisé mais est hybridé.

Ainsi, l'hybridation de la sonde P2A avec sa cible marquée Cy3 n'a pas fonctionné dans le système DLD. Le solvant organique permettant la réaction ne permet certainement pas une diffusion correcte du silane. De plus, le greffage des sondes et l'hybridation des cibles ont été réalisés dans des tampons aqueux sous flux. La diffusivité de ces molécules n'apparaît pas optimale dans le système microfluidique. Ces hypothèses permettent de soulever les points bloquants liés à ces résultats mitigés.

2.c. Limites de l'approche en phase liquide

La fonctionnalisation d'aptamères dans des composants DLD *via* la silanisation avec le carboxyéthylsilanetriol a permis de démontrer les limites de l'utilisation de la phase liquide pour la fonctionnalisation à grande échelle de composants DLD silicium. En effet, les canaux DLD doivent être fonctionnalisés un par un, rendant le processus long et répétitif. De plus, la résistance hydraulique élevée du composé microstructuré entraîne un temps de circulation très élevé de la solution de silane notamment, impliquant un temps important de manipulation (de l'ordre de 2 à 3 jours par composant). Cette méthode

nécessite de changer la solution à injecter de nombreuses fois et cela favorise d'autant plus l'introduction de bulles d'air dans le système fluidique entraînant ainsi des perturbations de l'écoulement et des variations de réactivité. Enfin, l'incompatibilité de la carte plastique avec les principaux solvants organiques pour la silanisation rend les stratégies alternatives de fonctionnalisation limitées. Ceci montre que la fonctionnalisation en phase liquide sur des composants DLD n'est pas pérenne et ne sera pas poursuivie dans ce projet de thèse.

3. Méthodes alternatives : fonctionnalisation en phases vapeur et supercritique pour le greffage d'oligonucléotides ADN sur substrats en silicium plans et microstructurés

3.a. Recours aux méthodes de fonctionnalisation en phases vapeur et supercritique

Ainsi, le recours au dépôt sans solvant en phases vapeur et supercritique est apparu être la solution la plus adéquate techniquement pour la fonctionnalisation des composants DLD post-microfabrication. Comme décrit au début de ce chapitre, les phases vapeur et supercritique permettent de silaniser des substrats silicium entiers (200 mm). En effet, disposer d'une étape de silanisation en phase vapeur ou CO_2SC permet d'envisager la fonctionnalisation d'un grand nombre de composants en parallèle disposant chacun de plusieurs canaux DLD à l'inverse de la phase liquide précédemment employée. En effectuant l'étape de silanisation à l'échelle du *wafer*, seul le greffage de l'aptamère reste à réaliser en voie liquide. En effet, l'utilisation de la phase vapeur n'est pas envisageable pour le greffage de biomolécules.

Ces deux approches ont été évaluées en parallèle pour la suite de la fonctionnalisation, et les silanes de choix ont été testés à la fois en phase vapeur et en CO_2SC. Dans un premier temps, les expériences ont été menées sur des substrats plans ainsi que sur des substrats microstructurés laissant toute la surface des canaux et des piliers simultanément accessibles au gaz ou au CO_2SC. Dans un second temps, les tests ont été menés sur des composants DLD où la surface à fonctionnaliser était accessible *via* les entrées fluidiques.

3.b. Évaluation comparée de différentes méthodes de fonctionnalisation pour le greffage d'oligonucléotides ADN : fonctionnalisation de substrats silicium plans et microstructurées

Avec l'objectif d'évaluer différentes stratégies de silanisation en phases vapeur et CO_2SC pour le greffage *in fine* d'oligonucléotides ADN, un plan d'expérience a été défini. Ce plan a pour but d'évaluer l'efficacité du greffage d'oligonucléotides ADN en fonction du type de silane choisi et de la méthode de silanisation employée. Pour cela, le greffage de sonde modèle (P2A) associé à l'hybridation de son complémentaire marqué Cy3 sera effectué. La lecture de la fluorescence est effectuée à 570 nm par un scanner de fluorescence (LS Reloaded Scanner, **TECAN**). Le plan d'expérience a été mené à la fois sur des substrats Si/SiO_2 plans mais aussi sur des subtrats Si/SiO_2 microstructurés (réseaux de piliers DLD ouverts, non recouverts du capot verre) pour évaluer l'impact de la structuration sur l'efficacité de la fonctionnalisation, en particulier le long des piliers du réseau DLD. Ceci permet d'appréhender la transposition d'un substrat plan à un substrat microstructuré tel qu'un composant DLD. La méthode de référence pour l'établissement de la comparaison est la chimie liquide APTES.

Les différentes stratégies envisagées sont synthétisées sur la *Figure 6.17.*

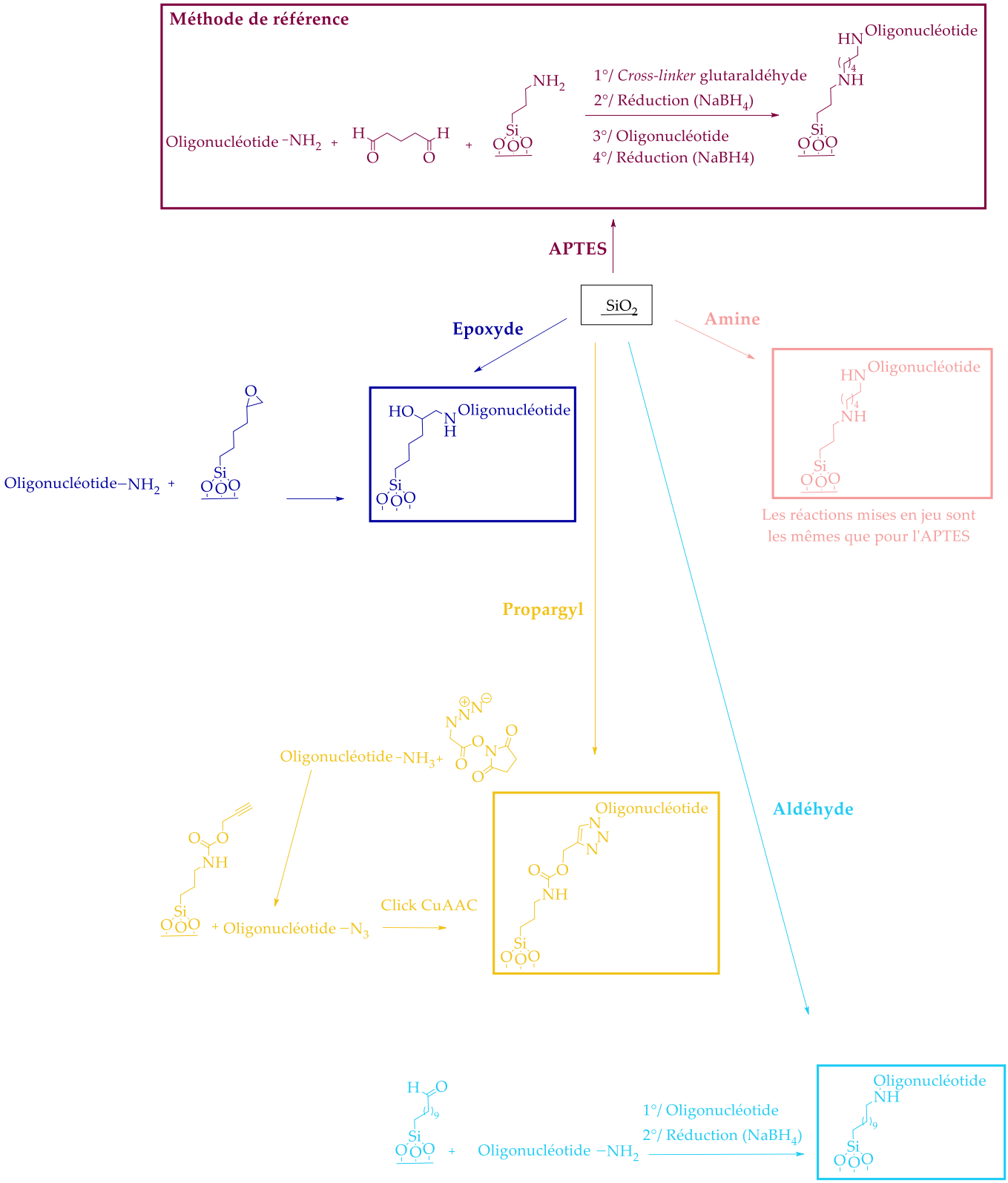


Figure 6.17 : Stratégies de silanisation en phases vapeur et CO_2SC pour le greffage d'oligonucléotides ADN en vue de la fonctionnalisation de composants DLD.

Les différents silanes utilisés sont récapitulés dans le tableau ci-dessous ainsi que les conditions de réactions.

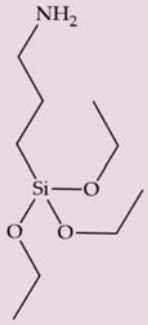
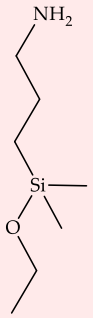
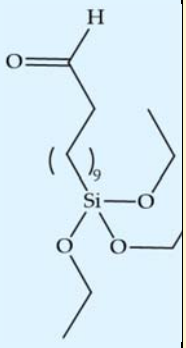
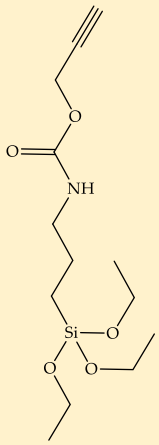
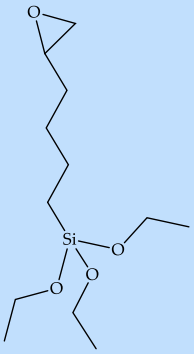
Silane	**APTES (référence)**	**Aminé**	**Aldéhyde**	**Propargyl**	**Époxyde**
Nom	(3-aminopropyl) triéthoxysilane	(3-aminopropyl) diméthyléthoxy silane	11-(triethoxysilyl) undecanal	O-(propargyloxy) -N-(triethoxy silylpropyl) urethane	5,6-époxyhexyl triéthoxysilane
Numéro CAS	919-30-2	18306-79-1	116047-42-8	870987-68-1	86138-01-4
Molécule					
Mise en œuvre	Liquide	Vapeur	Vapeur et CO_2SC	Vapeur et CO_2SC	CO_2SC
Équipement	-	Ecocoat	Ecocoat et SFD-200	Ecocoat et SFD-200	SFD-200
Cross-linker	Glutaraldéhyde	Glutaraldéhyde	-	-	-
Fonction impliquée dans le couplage	NH_2	NH_2	NH_2	N_3	NH_2

Tableau 6.1 : Récapitulatif des silanes utilisés pour la fonctionnalisation des substrats Si/SiO_2 plans et microstructurés et quelques caractéristiques associées.

Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 6.18*. Pour rappel, la fluorescence ne donne pas accès à une densité de molécules par unité de surface mais permet de comparer les différents protocoles entre eux.

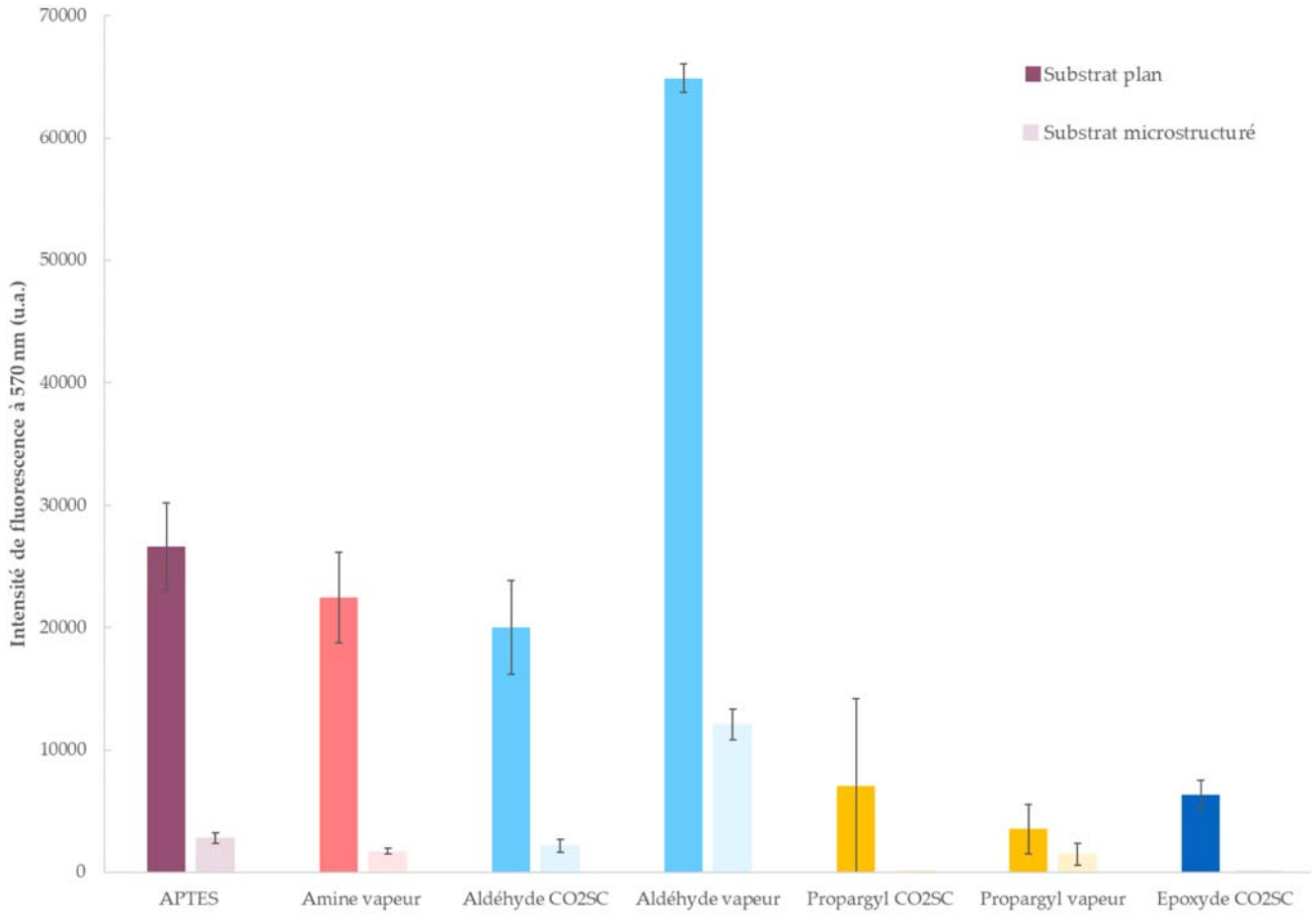


Figure 6.18 : Silanisations en phases vapeur et CO_2SC sur substrats Si/SiO_2 plans et microstructurés pour le greffage d'oligonucléotides ADN. Histogramme présentant les valeurs de fluorescence obtenues après greffage et hybridation des séquences complémentaires P2A après chaque méthode de silanisation sur des substrats Si/SiO_2 plans et microstructurés (ouverts).

En comparant les valeurs de fluorescence, on remarque une nette diminution du signal lorsque l'on passe sur substrats microstructurés (*Figure 6.18*). La micro-structuration du réseau de piliers DLD peut entraîner une diffusion de la fluorescence plus importante induisant une perte du signal en surface. Cette différence est illustrée ci-dessous en comparant visuellement les images de fluorescence obtenues sur ces deux types de substrats par silanisation APTES (*Figure 6.19*).

Figure 6.19 : Images de fluorescence obtenues après hybridation des oligonucléotides complémentaires P2A greffés sur deux types de substrats silicium par silanisation APTES.

Des résultats satisfaisants sont obtenus pour les silanes aminés sur substrats plans (*Figure 6.18)*. Cependant, leur utilisation nécessite l'introduction d'un *cross-linker* de type glutardaldéhyde. Cette étape

supplémentaire n'est pas compatible avec les composants DLD et ces stratégies ont été écartées pour des raisons techniques.

L'intensité de fluorescence obtenue après fonctionnalisation par le silane époxyde en phase CO_2SC n'est pas très élevée : 7 000 u.a. *versus* 27 000 u.a. (substrats plans) pour la méthode de référence (APTES). Cette faible valeur peut être liée au fait que ce type de chimie requiert classiquement l'ouverture du pont époxyde en milieu basique. Or, ces conditions n'étant pas compatibles avec la carte fluidique en COC, l'ouverture n'a pas été réalisée et la réactivité de l'époxyde a ainsi été diminuée. Au vu des résultats mitigés, cette stratégie a aussi été écartée. Cette silanisation n'a pas pu être testée en phase vapeur.

La chimie aldéhyde par phase CO_2SC est efficace et permet le greffage des sondes P2A aminées sur les substrats plans de façon comparable à la méthode de référence (APTES) : 20 000 u.a. *versus* 27 000 u.a. pour les substrats plans (*Figure 6.18)*. La fluorescence des substrats microstructurés est effectivement diminuée mais reste importante notamment pour la silanisation en phase vapeur. En phase vapeur, l'intensité de fluorescence relative à la fonctionnalisation par le silane aldéhyde dépasse 60 000 u.a. (substrats plans) et reflète la grande efficacité de cette silanisation.

Finalement, la chimie propargyl en phase vapeur n'a pas permis d'obtenir des résultats très satisfaisants par rapport à la méthode de référence (APTES). Cependant le nombre d'étapes de fonctionnalisation limité s'est avéré être un atout pour la fonctionnalisation des systèmes DLD.

Ce plan d'expérience a permis d'avoir une vision d'ensemble des stratégies chimiques envisageables au laboratoire en phase vapeur et CO_2SC. On a décidé d'étudier en parallèle deux stratégies différentes pour la fonctionnalisation de composants DLD : la chimie aldéhyde et la chimie propargyl.

3.c. Greffage d'oligonucléotides ADN dans les composants DLD en phases vapeur et CO_2 supercritique

Comme énoncé au-dessus, deux stratégies de chimie de surface ont été retenues pour le passage sur les composants DLD (fermés par le capot verre et fonctionnels) : les chimies aldéhyde et propargyl. Une fois, les silanisations effectuées dans les équipements Ecocoat et SFD-200, les composants ont été intégrés dans le système fluidique DLD et le greffage des oligonucléotides a été réalisé en flux.

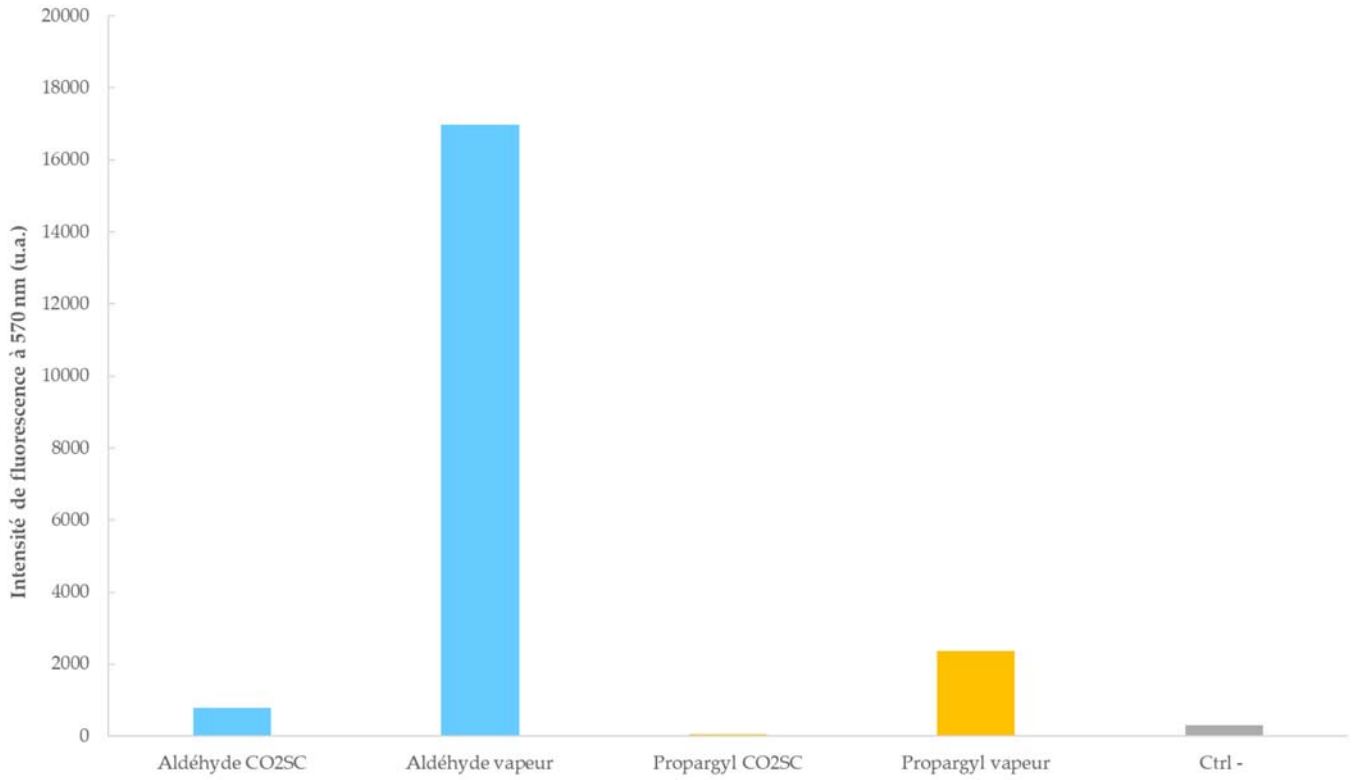


Figure 6.20 : Différentes silanisations en phases vapeur et CO_2SC sur les composants DLD pour le greffage d'oligonucléotides ADN. Histogramme présentant les valeurs de fluorescence obtenues après greffage et hybridation des séquences modèles P2A après silanisation en phases vapeur et CO_2SC des silanes aldéhyde et propargyl sur des composants DLD.

La *Figure 6.20* présente les résultats obtenus en fluorescence. Celle-ci correspond à l'hybridation de la séquence complémentaire à la sonde modèle P2A marquée Cy3. Les silanisations aldéhyde et propargyl réalisées en phase CO_2SC montrent des valeurs de fluorescence faibles du même ordre de grandeur que celle du contrôle négatif (greffage d'oligonucléotides sans silanisation préalable). La fluorescence correspond à du bruit de fond inhérent à l'expérience et permet de conclure à l'absence de fonctionnalisation des séquences d'oligonucléotides modèles dans les composants DLD. La fonctionnalisation par voie vapeur permet d'obtenir des valeurs de fluorescence très satisfaisantes. En effet, la valeur de fluorescence à 570 nm liée à l'hybridation des séquences P2A du substrat silicium fonctionnalisé par silane propargyl (environ 2 500 u.a.) est comparable aux valeurs obtenues sur substrat Si/SiO_2 plan et microstructuré (*Figure 6.18*). De même, pour la chimie aldéhyde réalisée en voie vapeur, la valeur de fluorescence associée est assimilable à celle obtenue sur substrat Si/SiO_2 microstructuré (*Figure 6.18*). La phase vapeur dans l'équipement Ecocoat associée à la chimie aldéhyde permet un greffage rapide d'oligonucléotide aminé dans les composants DLD. En effet, l'augmentation de la diffusivité permise par la phase vapeur a été un atout important pour la fonctionnalisation.

Bien que ces expériences n'aient pu être effectuées qu'une seule fois et ne permettent pas de vérifier leur reproductibilité, elles permettent de donner des pistes intéressantes pour la fonctionnalisation de composants DLD et renouvelle l'avantage de l'utilisation de la phase vapeur pour la fonctionnalisation.

4. Développement d'une stratégie de fonctionnalisation photoactivable en vue du multiplexage d'aptamères dans les composants DLD

Une fois la démonstration faite de la faisabilité de la fonctionnalisation des composants DLD par un oligonucléotide ADN et afin d'apporter une finalité diagnostique au système DLD couplé au tri biomarqueur-spécifique, le développement d'une stratégie chimique permettant le multiplexage est envisagé. Pour rappel, le multiplexage consiste à cibler différents biomarqueurs de surface à travers différentes sondes, à partir d'un même dispositif diagnostique. Fonctionnaliser un réseau DLD avec un aptamère unique apparaît peu intéressant d'un point de vue applicatif. Pourquoi se limiter à un unique biomarqueur ? Aujourd'hui, les systèmes POC permettent d'analyser de plus en plus de biomarqueurs en parallèle et cette tendance est effective quel que soit le domaine d'applications[407]. Pouvoir fonctionnaliser le réseau DLD avec différents aptamères ciblant différents biomarqueurs des EVs permettrait au dispositif DLD de proposer une solution complète d'isolement spécifique d'EVs pour le diagnostic cancéreux.

Dans cette étude, le multiplexage est réalisé à travers deux cibles, CD63 et EpCAM (**chapitre 3**), et ainsi permet d'envisager le capture d'EVs en fonction des biomarqueurs exprimés dans un système DLD unique. Cet objectif attrayant d'analyse complète des EVs (en taille et biomarqueur-spécifique) passe par le développement d'une fonctionnalisation localisée de différents aptamères au sein du composant DLD. La question ne consiste plus simplement à savoir si un oligonucléotide ADN peut être greffé dans un composant DLD mais à montrer que différents oligonucléotides peuvent être greffés à différentes localisations au sein d'un même composant DLD scellé. Pour répondre à cela, une stratégie de fonctionnalisation photoactivable a été développée. La localisation des aptamères au sein du canal DLD sera régionalisée à l'aide d'un masque permettant de définir une zone précise de fonctionnalisation. Cette régionalisation s'effectuera par une étape de photodéprotection du silane de façon à libérer les fonctions réactives avec les aptamères. Cette stratégie est articulée autour de quatre axes : la synthèse du silane photoactivable, le greffage de ce silane sur substrat plan par phase liquide dans un premier temps, puis la transposition en phase vapeur avec un substrat microstructuré et finalement, la fonctionnalisation de composants DLD fonctionnels par différents aptamères.

4.a. Synthèse chimique du triméthoxysilane photoactivable

La fonctionnalisation de surface du dispositif DLD par des aptamères nécessite l'utilisation d'un silane photoactivable permettant de faire le lien entre la surface en oxyde de silicium et l'aptamère. Dans cet objectif, deux molécules possédant ces caractéristiques ont été synthétisées : un triéthoxysilane portant une fonction oxyamine protégée par un groupement photosensible et son analogue triméthoxysilane (*Figure 6.21*). Dans l'optique de greffer plusieurs aptamères sur une même surface, la fonction oxyamine, réactive *in fine* avec l'aptamère, est protégée par un groupement photosensible (*Figure 6.21*). Cette caractéristique permet le greffage de l'aptamère à une position localisée sur la surface après exposition de cette surface à une certaine longueur d'onde.

Figure 6.21 : Conception du silane photoactivable

De précédents travaux au CEA Leti[408] rapportent la synthèse d'un triéthoxysilane portant une fonction oxyamine protégée par le groupement photosensible (NPPOC : 3'-Nitrophénylpropyloxycarbonyl) permettant de greffer trois séquences différentes d'oligonucléotides ADN dans un capillaire en voie liquide. Cependant, la fonctionnalisation de surface par le triéthoxysilane portant la fonction oxyamine protégée par le NPPOC photosensible en phase liquide nécessite l'utilisation de solvant organique incompatible avec la carte fluidique en plastique du dispositif DLD. Pour pallier ces difficultés, la silanisation en phase vapeur est envisagée. La fonction triméthoxysilane dispose d'avantages indéniables : elle présente une réactivité plus grande que son analogue triéthoxysilane, ne nécessite pas une catalyse basique par la triéthylamine pour être hydrolysée et elle est plus facilement vaporisable. C'est pour ces raisons que la fonction triéthoxysilane a été remplacée par une fonction triméthoxysilane dont la température d'ébullition est plus faible et théoriquement plus adaptée[409].

La synthèse du triméthoxysilane portant une fonction oxyamine protégée par le groupe photosensible NPPOC a été réalisée en deux étapes : une étape de protection et une étape d'hydrosilylation (*Figure 6.22*).

Figure 6.22 : Stratégie de synhtèse du triméthoxysilane photoactivable.

La première étape est une réaction de protection de la fonction oxyamine, du réactif 3-hydroxylamine propène, par le groupement photosensible 2-(2-nitrophényl)-propyle sous forme de chloroformiate (*Figure 6.23*).

Figure 6.23 : Protection du 3-hydroxylamine propène par NPPOC.

Cette réaction est effectuée dans un mélange dichlorométhane/pyridine (1 : 1 ; v : v) à température ambiante. Le suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) montre qu'elle est terminée au bout de 30 minutes. Après réaction, une étape d'extraction acétate d'éthyle/eau permet l'élimination du sel de chlorure de pyridinium formé au cours de la réaction. Enfin, un rendement de 88% est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice en phase normale. L'analyse RMN ^{1}H du produit dans le chloroforme deutéré valide l'obtention du produit d'intérêt : le singulet intégrant le signal du proton à 7,85 ppm correspond au proton porté par l'oxyamine protégé par NPPOC. De plus, aucun pic caractéristique des protons portés par l'amine de l'oxyamine libre n'est pas observé (attendu entre 6 et 8 ppm), montrant la disparition du réactif allyloxyamine après purification et la pureté du produit synthétisé (*Figure 6.24*).

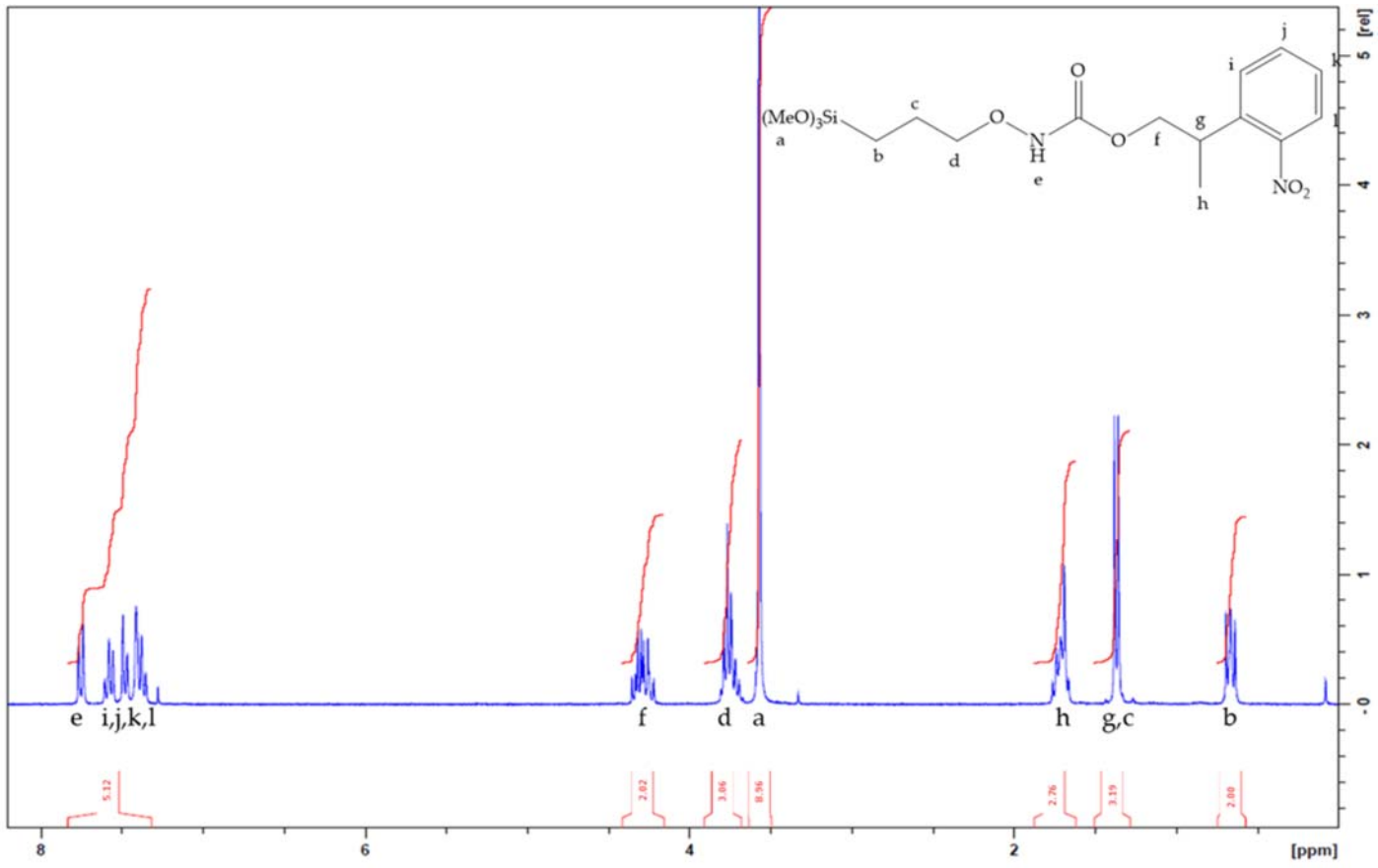


Figure 6.24 : Spectre RMN ^{1}H du triméthoxysilane photoactivable synthéthisé dans $CDCl_3$.

Dans un deuxième temps, une hydrosilylation de la double liaison, portée par le 3-hydroxylamine-propène protégé par NPPOC, est effectuée en présence du catalyseur de Karstedt (*Figure 6.25*).

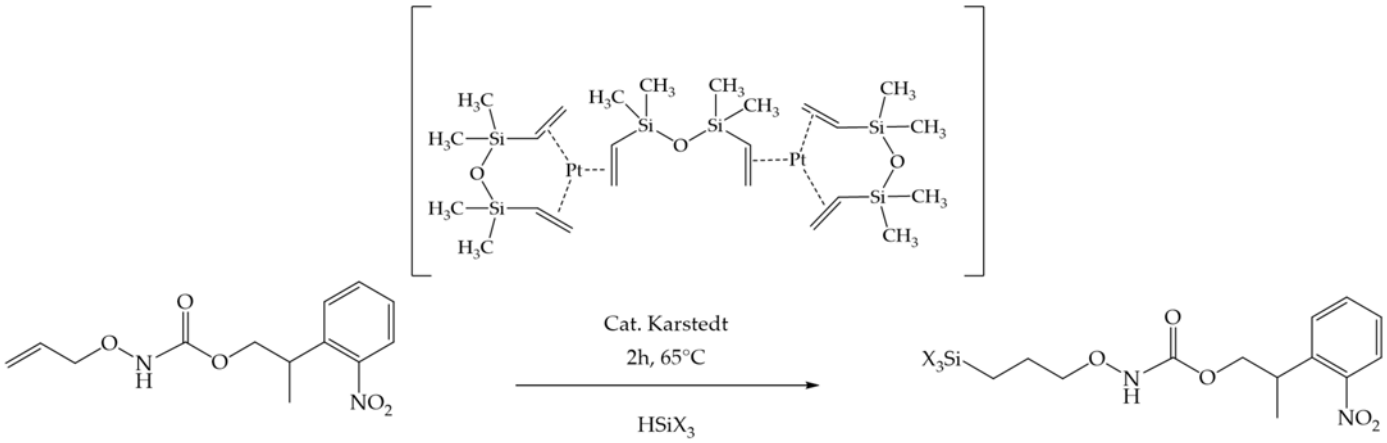


Figure 6.25 : Hydrosilylation de l'acide carbamique, (2-propènyloxy)-,2-(2-nitrophényl)propyl ester.

Lors de cette réaction, le réactif trialkoxysilane joue également le rôle de solvant. Ce dernier est éliminé après réaction par distillation sous vide. Un rendement de 48% est obtenu après purification du triméthoxysilane photosensible par chromatographie sur gel de silice. Cette méthode de purification n'est pas adaptée compte tenu de la réactivité des organosilanes vis-à-vis de la silice. Le rendement obtenu lors de la synthèse du triméthoxysilane est plus bas. Cela peut être expliqué par sa réactivité accrue avec la silice de la colonne de chromatographie[410]. Cependant, afin d'augmenter le rendement de la synthèse du triméthoxysilane, une purification par distillation pourra être envisagée pour la suite de l'étude. Le spectre RMN ^{1}H réalisé dans le chloroforme deutéré ($CDCl_3$) du triméthoxysilane photoactivable confirme la structure du produit attendu : le pic à 0,65 ppm est caractéristique des deux protons en position α du silicium ce qui témoigne de l'obtention du produit d'intérêt. De plus, la disparition des protons allyliques autour de 5 ppm confirme la disparition du produit de départ (*Figure 6.24*).

4.b. Fonctionnalisation de substrats silicium plans par la stratégie de silane photoactivable en phase liquide pour le greffage localisé d'aptamères

Une fois la synthèse chimique du triméthoxysilane photosensible réalisée, le développement de la chimie de surface pour la fonctionnalisation des substrats Si/SiO_2 est mise en œuvre. Pour cela, dans un premier temps, la validation du principe sur substrats plans est réalisée par le triéthoxysilane photoactivable précédemment utilisé au laboratoire[408]. Les substrats sont activés par plasma O_2 puis plongés durant une nuit dans une enceinte contenant le triéthoxysilane à 5 mM dans un mélange toluène/triéthylamine (97 : 3 ; v : v) sous agitation orbitalaire. Après des lavages au toluène, à l'éthanol puis à l'eau, les substrats sont recuits à 110°C durant 3 heures. Une caractérisation de spectrométrie MIR-IR a été effectuée après silanisation et a permis de conclure à la présence du silane photoactivable à la surface du substrat par l'apparition de bandes signatures des fonctions chimiques portées par ce silane (*Figure 6.26*).

Figure 6.26 : Spectre MIR-IR obtenu après fonctionnalisation d'un substrat Si/SiO_2 plan par le triméthoxysilane photoactivable.

Une première étape de déprotection localisée est réalisée afin de libérer les fonctions oxyamines pour le greffage des aptamères. Un masque est placé sur le composant après avoir préalablement déposé une veine liquide aqueuse, la surface est ensuite insolée à 90 W/cm^2 durant 10 secondes à l'aide d'une lampe UV à une longueur d'onde de 365 nm. Le masque utilisé contient des plots de 200 µm de diamètre espacés de 100 µm. Cette étape de photodéprotection est illustrée sur la *Figure 6.27*.

Figure 6.27 : Photodéprotection de l'oxyamine.

L'aptamère CD63-1, accessible commercialement avec une fonction diol en position terminale, est ensuite activé avec une fonction aldéhyde en position terminale par l'action du périodate de sodium (50 équivalents) à température ambiante durant 1 heure sous agitation à 20 µM dans le tampon acétate d'ammonium 0,4 M à pH = 4,6 (*Figure 6.28*).

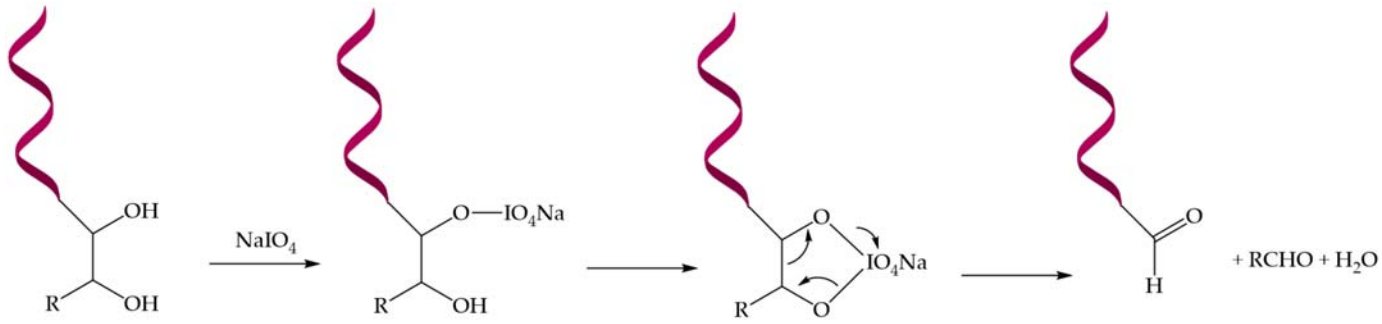


Figure 6.28 : Oxydation des diols vicinaux d'un oligonucléotide par le périodate de sodium.

Le brut réactionnel est directement déposé sur le substrat déprotégé et le couplage oxyamine – aldéhyde est effectif en 2 minutes. Le couplage oxyamine - aldéhyde est présenté ci-dessous (*Figure 6.29*).

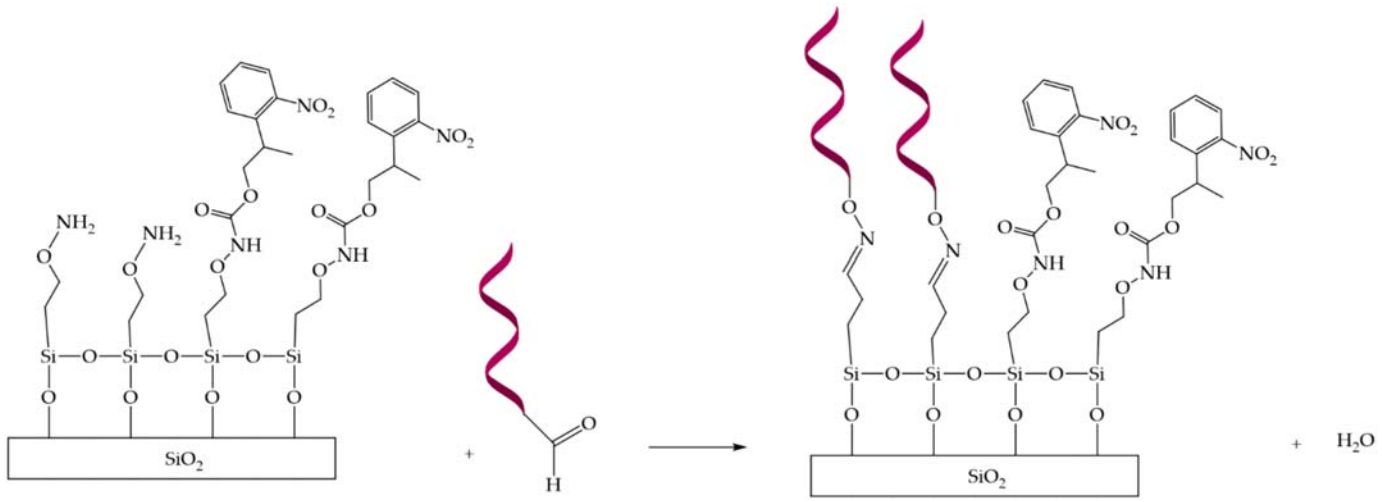


Figure 6.29 : Couplage oxyamine – aldéhyde pour le greffage d'aptamère sur la surface silicium fonctionnalisée par le triméthoxysilane photoactivable.

Cette étape de photodéprotection et de greffage d'aptamère est répétée pour l'aptamère EpCAM sur une seconde région du canal DLD. La fonctionnalisation localisée est ensuite révélée par hybridation des complémentaires aux aptamères CD63-1 et EpCAM par les séquences CD63-1-c1 marquées Cy3 ($\lambda_{excitation}$ = 550 nm et $\lambda_{émission}$ = 570 nm) et EpCAM-c1 marquées Cy5 ($\lambda_{excitation}$ = 650 nm et $\lambda_{émission}$ = 670 nm). Pour cela, une solution de brins complémentaires CD63-1-c1 et EpCAM-c1 à 10 nM chacun est réalisée dans le tampon d'hybridation (SSC2X) et déposée sur les substrats à 40°C durant 1 heure. Après deux lavages réalisés avec le tampon d'hybridation (SSC 0,2X puis 0,02X), la fluorescence est collectée par le scanner de fluorescence (LS Reloaded Scanner, **TECAN**). Les différentes étapes sont synthétisées sur la *Figure 6.30*.

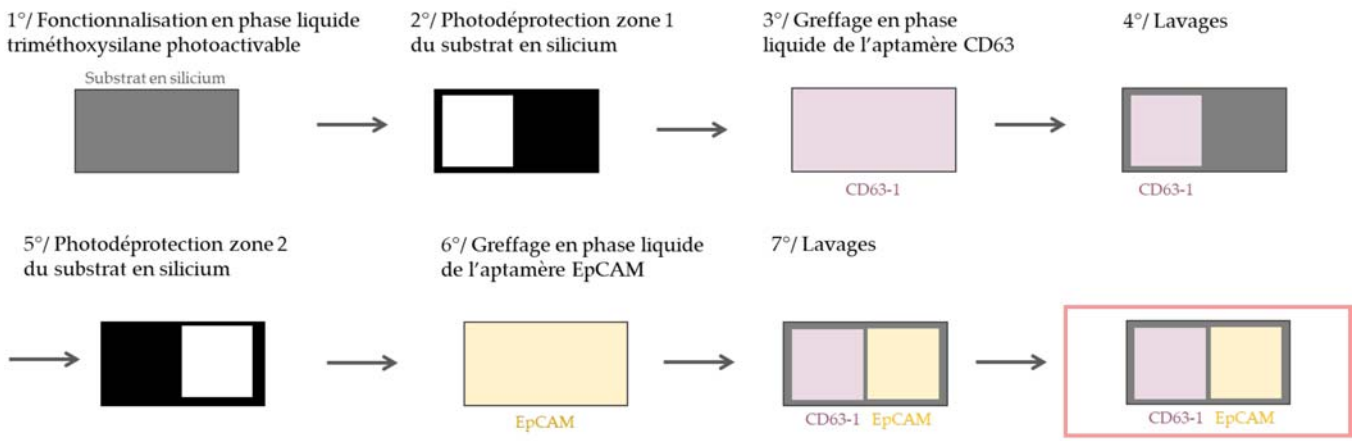


Figure 6.30 : Schéma récapitulatif des étapes de fonctionnalisation d'un substrat en silicium par la stratégie de chimie photoactivable.

Les images de fluorescence sont présentées sur la *Figure 6.31* et démontrent la fonctionnalisation effective à gauche du substrat de l'aptamère CD63-1 et à droite du substrat EpCAM. Le *patterning* sous forme de plot par le masque appliqué lors de la déprotection est visible sur les images. Les motifs du masque ont été reportés sur la surface. Les niveaux de fluorescence observés sont de l'ordre de 20 000 u.a. pour l'aptamère CD63-1 et un peu en dessous pour l'aptamère EpCAM. Les contrôles négatifs ont un niveau de fluorescence de l'ordre de 5 000 u.a. cela démontre la fonctionnalisation effective des aptamères sur les substrats silicium plans. La différence de fluorescence observée entre CD63-1 et EpCAM pourrait s'expliquer par le fait que les brins complémentaires de ces deux aptamères ne sont pas marqués par le même fluorophore : Cy3 pour CD63-1-c1 et Cy5 pour EpCAM-c1. Or, Cy3 émet une intensité de fluorescence lorsqu'il est excité à la longueur d'onde optimale plus importante que Cy5 dans ses propres conditions optimales.

Figure 6.31 : Fonctionnalisation localisée de différents aptamères CD63-1 et EpCAM par le triéthoxysilane photoactivable sur un substrat Si/SiO_2. L'image du haut a été réalisée avec un laser excitant à 532 nm correspondant au fluorophore Cy3 tandis que l'image du bas a été réalisée avec un laser excitant à 635 nm correspondant au fluorophore Cy5. Un traitement des images de fluorescence Rainbow a été réalisé sur le logiciel Genepix®. L'échelle de fluorescence est donnée en unités arbitraires.

Une fois validée sur substrat plan avec le triéthoxysilane photoactivable en phase liquide, la fonctionnalisation par le triméthoxysilane photoactivable en phase liquide puis en phase vapeur est étudiée. Le triméthoxysilane photoactivable en phase liquide est greffé sur les substrats Si/SiO_2 selon le même protocole que celui utilisé pour le triéthoxysilane photoactivable. En phase vapeur, la solution est chauffée à 160°C à une pression de 0,2 mbar dans le système Ecocoat durant 16 heures. Les résultats sont présentés sur la *Figure 6.32*. Toute la surface a été silanisée. Seuls les plots (200 µm de diamètre) ont été déprotégés et l'aptamère a réagit spécifiquement sur le silane déprotégé.

Figure 6.32 : Fonctionnalisation localisée de l'aptamère CD63-1 hybridé avec les séquences complémentaires marquées Cy3 sur des substrats silicium plan par les silanes photoactivables en phase liquide et vapeur. a) Images de fluorescence de fonctionnalisation localisée de l'aptamère CD63-1 par respectivement de gauche à droite le triéthoxysilane en phase liquide, le triméthoxysilane en phase liquide et le triméthoxysilane en phase vapeur. Les images ont été réalisées avec un laser excitant à 532 nm correspondant au fluorophore Cy3. Un traitement des images de fluorescence Rainbow a été réalisé sur le logiciel Genepix®. L'échelle de fluorescence est donnée en unités arbitraires. b) Comparaison des différentes silanisations par triéthoxysilane et triméthoxysilane en phases liquide et vapeur. Histogramme des valeurs de fluorescence obtenues sur les plots d'aptamères et en bruit de fond.

La première partie de la figure (*Figure 6.32a*) montre les images de fluorescence obtenues après le greffage de l'aptamère CD63-1 sur un substrat fonctionnalisé par le triéthoxysilane photoactivable en phase liquide et par le triméthoxysilane photoactivable en phase liquide et ensuite en phase vapeur. Les niveaux de fluorescence observés (*Figure 6.32b*) sont relativement équivalents au vu des signaux relatifs au bruit intrinsèque à l'expérience. Le triméthoxysilane photoactivable en phase vapeur permet d'obtenir une fonctionnalisation d'un niveau équivalent à la phase liquide aussi bien pour le triméthoxysilane que pour le triéthoxysilane. L'utilisation du triméthoxysilane photoactivable en phase vapeur pour ses propriétés de réactivité et son potentiel de vaporisation plus important a été confirmé par ces résultats sur substrats plans. Cette approche, très encourageante pour la fonctionnalisation des composants DLD, est exposée dans la section suivante.

4.c. Fonctionnalisation en phase vapeur de composants DLD pour le greffage localisé d'aptamères en vue du développement d'un système multiplexe

La fonctionnalisation du silane photoactivable en phase vapeur a été validée sur substrats Si/SiO_2 plans et permet désormais de réaliser la fonctionnalisation de composants DLD nano-ciblés. Le protocole utilisé est très similaire à celui des substrats plans en ce qui concerne la silanisation. Une fois le substrat fonctionnalisé par le silane photoactivable en phase vapeur, le greffage des aptamères CD63-1 est réalisé en phase liquide à l'aide du banc fluidique dédié au système DLD nano-ciblé. La solution d'aptamère, préalablement oxydée pour avoir l'aldéhyde, est injectée à 20 µM durant 30 minutes à 4 bars dans les entrées fluidiques puis des lavages sont réalisés avec une solution de SDS 1% (v : v) et de l'eau. Finalement, ces étapes sont répétées afin de fonctionnaliser la seconde partie du dispositif DLD avec l'aptamère EpCAM. Les différentes étapes sont résumées sur la *Figure 6.33*.

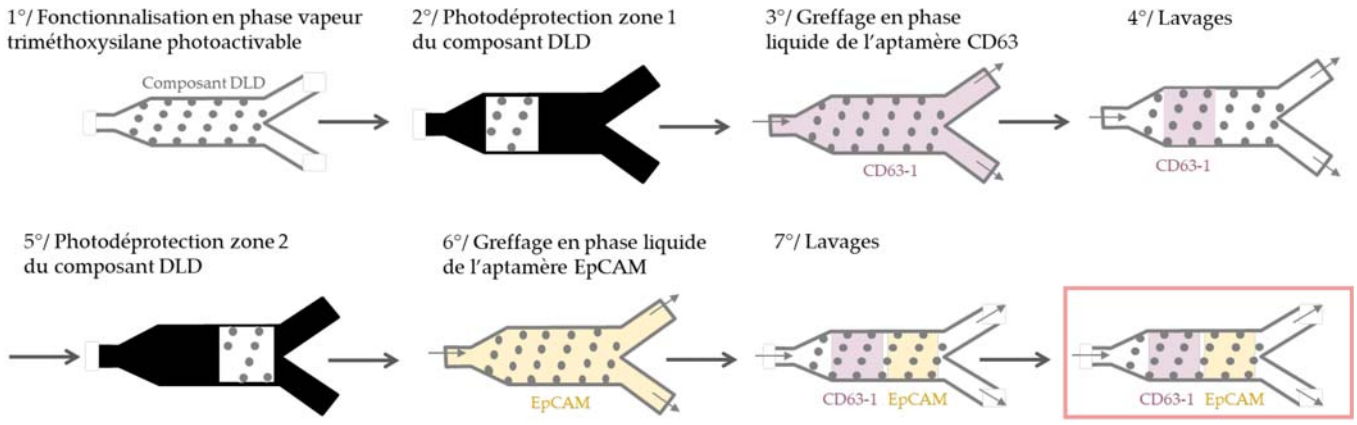


Figure 6.33 : Schéma récapitulatif des étapes de fonctionnalisation du composant DLD pour aboutir au système DLD biomarqueur-spécifique.

Une fois la fonctionnalisation des aptamères réalisée, les séquences complémentaires sont hybridées à leurs sondes respectives dans le composant DLD. Une solution à 10 nM dans le tampon d'hybridation SSC2X est injectée dans le système fluidique durant 1 heure et celui-ci est placé dans une étuve à 40°C. Finalement après les lavages adéquats, la fluorescence est lue par le scanner de fluorescence (LS Reloaded Scanner, **TECAN**) à deux longueurs d'onde différentes correspondants aux fluorophores Cy3 et Cy5 (CD63-1-c1-Cy3 et EpCAM-c1-Cy5).

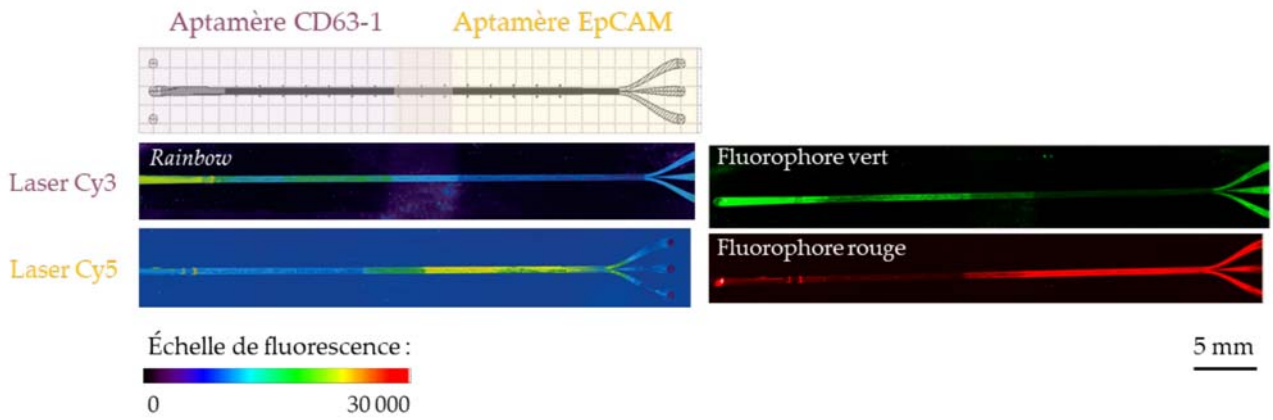


Figure 6.34 : Images de fluorescence de fonctionnalisation localisée des aptamères CD63-1 et EpCAM le long du canal DLD par le triméthoxysilane photoactivable déposé en phase vapeur. Les images ont été réalisées avec un laser excitant à 532 nm correspondant au fluorophore Cy3 et à 635 nm pour le fluorophore Cy5. Un traitement des images de fluorescence Rainbow a été réalisé sur le logiciel Genepix® sur les images de gauche et un second traitement a été réalisé par ce même logiciel sur les images de droite, présentation monochrome. L'échelle de fluorescence est donnée en unités arbitraires.

La *Figure 6.34* présente les images de fluorescence obtenues par fonctionnalisation photochimique du système DLD nano-ciblé par silanisation en phase vapeur du triméthoxysilane photoactivable puis greffage localisé de l'aptamère CD63-1 sur la première moitié du canal DLD et de l'aptamère EpCAM sur la seconde moitié du canal. Les images montrent effectivement la présence de fluorescence intense sur la première moitié du canal après excitation par le laser correspondant à Cy3, fluorophore de la séquence complémentaire à l'aptamère CD63-1. La seconde moitié du canal dispose d'une fluorescence intense lorsqu'elle est excitée par le laser correspondant à Cy5, fluorophore de la séquence complémentaire à l'aptamère EpCAM. Cependant, on peut remarquer que les niveaux de fluorescence ne sont pas homogènes entre la zone de fonctionnalisation par l'aptamère CD63-1 et celle de l'aptamère EpCAM. En effet, deux paramètres peuvent expliquer cela. Lors de la première photodéprotection, l'aptamère CD63-1 est injecté dans le système et se greffe au silane déprotégé par sa fonction aldéhyde libre. Cependant, une incertitude persiste quant à la fonctionnalisation de toutes les fonctions oxyamines libres. Ainsi, si certaines n'ont pas été fonctionnalisées, lors de la fonctionnalisation de la seconde zone par l'aptamère EpCAM, ce dernier peut aussi se greffer sur les oxyamines libres de la première zone. Ce phénomène peut induire la pollution observée en fluorescence, dans la zone proche de l'entrée fluidique. Par ailleurs, la zone fonctionnalisée par CD63-1 est proche de l'entrée tandis que la zone EpCAM est proche des trois sorties du réseau. Ainsi, une meilleure fonctionnalisation peut être obtenue lorsque le nombre d'ouverture fluidique est plus grand du fait d'une plus grande diffusivité possible du silane.

La fonctionnalisation du système DLD nano-ciblé est donc démontrée par localisation ciblée de deux aptamères différents. Dans l'optique de l'utilisation d'un nombre d'aptamères plus importants afin de cibler plus de deux biomarqueurs sur les EVs, la fonctionnalisation alternée des deux aptamères en cinq zones distinctes a été répétée le long du canal DLD.

Figure 6.35 : Images de fluorescence de fonctionnalisation localisée et répétée des aptamères CD63-1 et EpCAM le long du canal DLD par le triméthoxysilane photoactivable déposé en phase vapeur. Les images ont été réalisées avec un laser excitant à 532 nm correspondant au fluorophore Cy3 et à 635 nm pour le fluorophore Cy5. Un traitement des images de fluorescence Rainbow a été réalisé sur le logiciel Genepix®. L'échelle de fluorescence est donnée en unités arbitraires.

La *Figure 6.35* montre les images de fluorescence correspondantes. L'alternance des zones fonctionnalisées CD63-1 et EpCAM est nettement visible par le signal fluorescent le long du canal DLD. Il est intense sur l'image du haut (laser Cy3) puis sur l'image du bas (laser Cy5) et ainsi de suite tout le long du canal. La même observation faite dans le paragraphe ci-dessus quant à la variabilité du signal fluorescent dans le canal peut être. En effet, la présence de trois sorties semble favoriser la fonctionnalisation du silane photoactivable en phase vapeur. La stratégie de chimie basée sur le triméthoxysilane photoactivable est très prometteuse et a permis de réaliser la fonctionnalisation de composants DLD nano-ciblés de quelques centimètres de long en cinq zones distinctes. Effectivement, il serait nécessaire d'optimiser la fonctionnalisation multi-localisations du composant DLD. Mais ceci démontre la faisabilité du multiplexage de différents biomarqueurs d'intérêts des EVs et permet d'envisager de nouveaux défis à relever pour le diagnostic de cancer en utilisant le système DLD de tri en taille nanométrique et biomarqueur-spécifique par un large panel d'aptamères.

5. Intégration d'aptamères dans le système de tri DLD : capture et relargage contrôlé de vésicules extracellulaires EpCAM$^+$

Le dispositif DLD nano-ciblé étant désormais fonctionnalisable par des aptamères, les EVs peuvent ainsi être triées à la fois en taille et en fonction de leurs biomarqueurs dans ce système unique. Ainsi, dans un objectif de preuve de concept, un composant DLD nano-ciblé D_c = 350 nm a été fonctionnalisé par le triméthoxysilane photoactivable en phase vapeur puis l'aptamère EpCAM a été greffé en phase liquide. La fonctionnalisation par l'aptamère EpCAM a été démontrée par hybridation de son brin complémentaire marqué Cy5 et présentée sur la *Figure 6.36*.

Figure 6.36 : Images de fluorescence de fonctionnalisation de l'aptamère EpCAM hybridé à son complémentaire marqué Cy5 le long du canal DLD, après silanisation par le triméthoxysilane photoactivable déposé en phase vapeur. Les images ont été réalisées avec un laser excitant à 635 nm pour le fluorophore Cy5. Un traitement des images de fluorescence Rainbow a été réalisé sur le logiciel Genepix®. L'échelle de fluorescence est donnée en unités arbitraires.

Des EVs issues des cellules MCF-7 ont été isolées par la méthode standard d'UC et ont été resuspendues dans une solution de PBS selon le protocole standard utilisé dans le **chapitre 2**. Les EVs issues de cellules MCF-7 disposent pour certaines d'entre elles de la protéine EpCAM à leur surface et peuvent ainsi être capturées par l'aptamère correspondant, comme démontré aux **chapitres 3 et 4** notamment.

Un schéma de principe de tri en taille DLD associé au tri EpCAM-spécifique est présenté sur la *Figure 6.37.*

Figure 6.37 : Schéma de principe du tri en taille par le principe DLD associé au tri EpCAM-spécifique.

La solution d'EVs (700 µL à 10^8 EVs/mL environ) a été injectée dans le système DLD D_c = 350 nm fonctionnalisé par l'aptamère EpCAM à 4 bars durant 4 heures. Les EVs ont été triées par taille et celles disposant de la protéine EpCAM sont été retenues sur les piliers fonctionnalisés par l'aptamère. Les EVs $EpCAM^-$ ont rapidement été collectées dans les différentes sorties uniquement en fonction de leur taille. Les EVs $EpCAM^+$ retenues sur les aptamères dans le canal DLD ont été ensuite éluées par injection de la solution de brins complémentaires de l'aptamère EpCAM (10 nM dans le tampon d'hybridation SSC2X).

Les EVs EpCAM+ sont alors collectées dans les sorties du système DLD. Les EVs non retenues (EpCAM-) et les EVs relarguées (EpCAM+) ont ensuite été analysées par NTA. Pour des raisons de complexité de mise en œuvre de cette expérience préliminaire, les analyses NTA ont été réalisées uniquement dans les sorties non-déviées et les sorties déviées n'ont pas été analysées du fait de la très faible quantité d'échantillon collectée. En effet, le temps de manipulation est restreint à une journée pour la capture (environ 3-4 heures) et le relargage (durée équivalente) et ne permet donc pas de collecter des volumes suffisants dans la sortie déviée pour l'analyse NTA (minimum 300 µL à 10^6 EVs/mL).

La *Figure 6.38a* présente les résultats des analyses NTA des EVs issues des cellules MCF-7 obtenues par ultracentrifugation. L'histogramme correspond au profil de taille et de fraction relative de l'échantillon d'EVs MCF-7 et présente deux sous-populations majoritaires autour de 125 et 200 nm. Après le tri effectué par le système DLD EpCAM-spécifique : les EVs non capturées par l'aptamère EpCAM (EpCAM-) présentent un profil de taille de 50 à 250 nm (*Figure 6.38b*) tandis que les EVs capturées puis relarguées (EpCAM+) ont une population allant de 0 à 250 nm avec une population importante autour de 50 à 100 nm (*Figure 6.38c*). Finalement, une absence de population de taille supérieure à 200 nm peut être remarquée sur les histogrammes des sorties non-déviées, ce qui est cohérent avec le tri en taille démontré au **chapitre 5**.

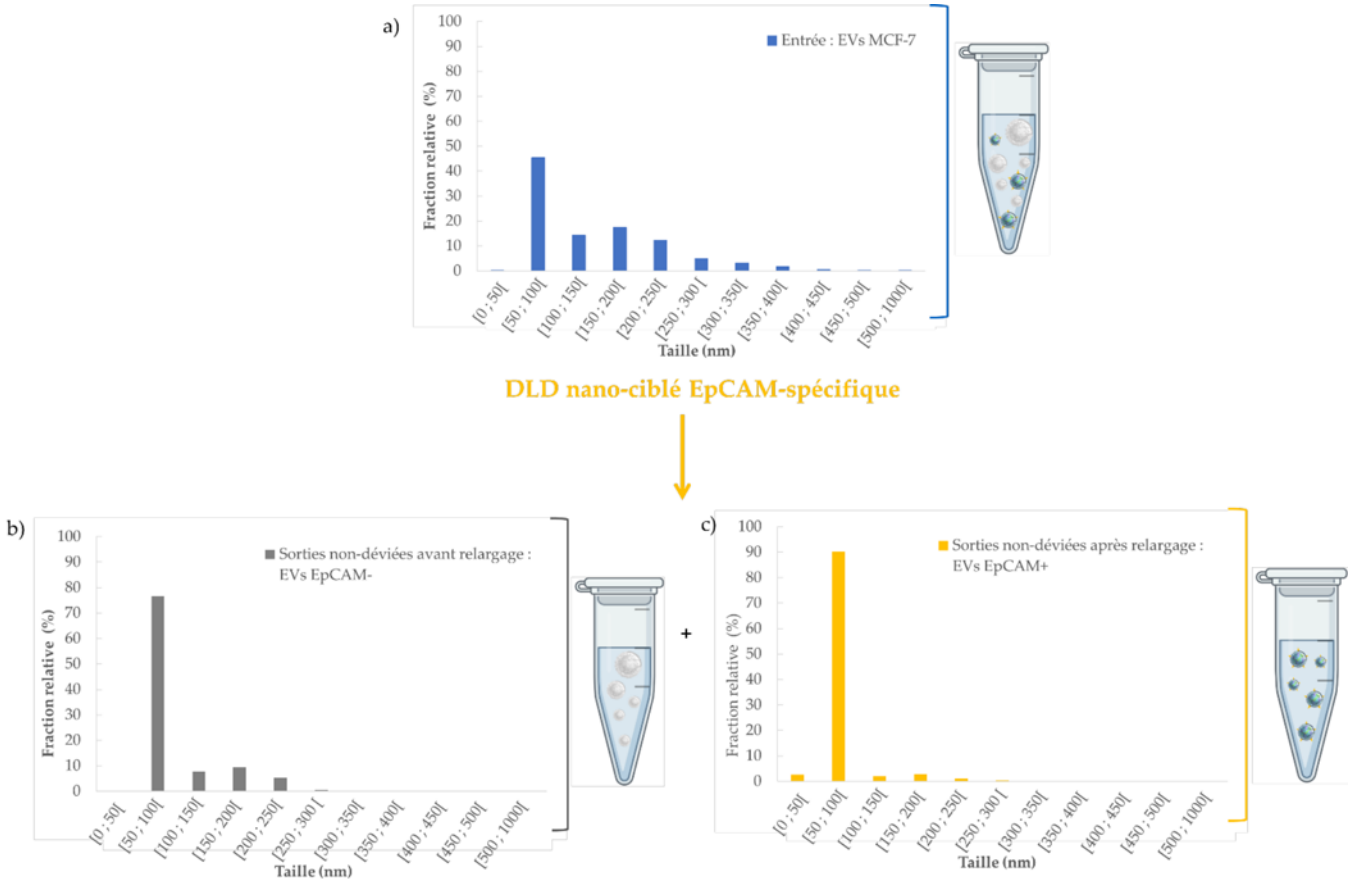


Figure 6.38 : Isolement d'EVs EpCAM+ par le système DLD D_c = 350 nm EpCAM-spécifique. a) Histogramme du profil de taille des EVs issues des cellules MCF-7 isolées par UC ; b) Histogramme du profil de taille des EVs collectées avant relargage (EpCAM-) ; c) Histogramme du profil de taille des EVs collectées après capture et relargage (EpCAM+). Chaque condition représente une expérience mais chaque analyse NTA comptabilise le suivi de plus de 1 000 particules.

Ainsi des tendances peuvent être tirées quant à la taille des sous-populations exprimant la protéine EpCAM. La protéine EpCAM semble être exprimée dans les EVs de taille assez hétérogène allant de 0 à 200 nm avec une population importante entre 50 et 100 nm. Cette même tendance a été tirée des expériences menées dans le **chapitre 4** par capture supportée des EVs par l'aptamère et isolées par le système DLD micro-ciblé. Ces résultats restent tout à fait préliminaires et n'ont pas pu être répétés au vu du temps imparti à ce projet de thèse. De plus, la présence de la protéine EpCAM doit encore être confirmée dans les EVs collectées après relargage pour valider le principe de capture et relargage. Cependant, les quantités d'EVs collectées sont très faibles et des optimisations des tests ELISA direct doivent être réalisées afin de pouvoir mettre en évidence la présence de la protéine EpCAM. De plus, les techniques classiques d'identification de protéines comme le WB ne sont pas applicables au vu des faibles quantités d'EVs collectées (EVs non capturées = 400 µL à 10^8 EVs/mL et EVs capturées = 250 µL à 10^8 EVs/mL) En parallèle de l'optimisation des tests ELISA, des expériences préliminaires de spectrométrie de masse sont en cours de réalisation afin d'envisager deux méthodes distinctes, disposant chacune de leur propre sensibilité, pour la détection de la protéine d'intérêt.

6. Conclusions et Perspectives

Ce chapitre avait pour but de montrer l'association du tri en taille par le système DLD et biomarqueur-spécifique par les aptamères rendu possible par la chimie de surface. Après avoir présenté les différentes méthodes de silanisation possibles de substrats silicium, la voie liquide, la plus simple à mettre en œuvre au laboratoire a été réalisée. L'approche en voie liquide utilisant le carboxyéthylsilanetriol dans l'eau pour la fonctionnalisation de systèmes DLD s'est avérée peu fructueuse et n'a pas permis de conclure à la fonctionnalisation effective du réseau de piliers par les oligonucléotides ADN. De plus, les étapes de silanisation, habituellement réalisées en bain, ont dû être adaptées sur le banc fluidique DLD par des injections *via* l'entrée fluidiques, elles se sont révélées très fastidieuses et ne permettent pas de mener à bien le projet. L'approche de silanisation en phases vapeur ou CO_2SC ont été retenues car elles sont adaptées à la fonctionnalisation de dispositifs microfluidiques fermés comme les composants DLD. Le silane aldéhyde déposé en phase vapeur a permis de greffer les sondes d'oligonucléotides à l'intérieur des composants DLD, prouvant ainsi la fonctionnalisation de composants DLD par des oligonucléotides. Pour multiplexer la réponse, une stratégie de chimie de surface photoactivable permettant de localiser la fonctionnalisation d'aptamères a été développée. Cette approche s'est avérée particulièrement efficace et a permis de localiser jusqu'à cinq zones distinctes dans le canal DLD nano-ciblé D_c = 350 nm. Ce système complet associant tri en taille et tri biomarqueur-spécifique doit désormais être confronté aux échantillons biologiques complexes pour envisager ce système comme alternative aux méthodes classiques d'isolement et de caractérisation des EVs : l'UC et l'ELISA par exemple. Ainsi, afin d'amorcer les prémices de ces tests, le tri d'EVs MCF-7, préalablement isolées par UC, dans le système DLD D_c = 350 nm fonctionnalisé par EpCAM a été réalisé et a permis de conclure que la taille de la sous-population d'EVs $EpCAM^+$ est fortement présente entre 0 et 100 nm. De nombreux axes de perspectives peuvent être proposés, tant de voies possibles restent à explorer. Il s'agit dans un premier temps de consolider les résultats préliminaires obtenus, concernant d'un côté la caractérisation des échantillons biologiques et de l'autre, la fonctionnalisation des systèmes DLD nano-ciblé. Finalement, travailler sur la réflexion de la localisation de la fonction tri biomarqueur-spécifique dans le réseau de piliers DLD semble être une approche intéressante pour proposer un tri efficace et pertinent d'EVs. En effet, la possibilité d'ajouter en fin de DLD

une micro-structuration permettant d'augmenter la surface de contact des EVs sur les murets ou piliers est une approche intéressante à poursuivre et pourrait complètement s'intégrer dans la conception de la génération suivante de composants DLD.

Résumé – Intégration d'aptamères dans le système DLD appliquée à l'isolement de vésicules extracellulaires d'intérêt – Évaluation des stratégies de chimie de surface sur silicium pour la fonctionnalisation d'oligonucléotides ADN

- Une première approche de silanisation en phase liquide sur des substrats Si/SiO_2 plans et sur les composants DLD a été abordée, mais finalement écartée au profit d'une approche en phase gazeuse. Afin de développer une approche de chimie de surface compatible avec les particularités des composants DLD (microstructuration, scellement silicium-verre, résistivité hydraulique importante notamment), l'étape de silanisation en phase vapeur ou CO_2 supercritique a été choisie pour limiter les étapes en phase liquide.

- Différents silanes ont été testés à la fois par dépôt en phase vapeur et CO_2 supercritique. Les silanes aldéhyde et propargyl sont apparus comme les plus prometteurs pour la fonctionnalisation dans les composants DLD en phase vapeur. Leur utilisation permet *in fine* le greffage d'un aptamère.

- Pour développer un système DLD multiplexe, une nouvelle stratégie de silane photoactivable déposé en phase vapeur a été réalisée. Elle permet de fonctionnaliser les composants DLD jusqu'aux dispositifs DLD nano-ciblés D_c = 350 nm et de localiser jusqu'à cinq zones distinctes d'aptamères le long du canal DLD.

- Finalement, un premier test de tri DLD biomarqueur-spécifique a été réalisé dans un système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm, fonctionnalisé par l'aptamère EpCAM. Ces prémices encourageantes permettent d'établir la preuve de concept de l'intérêt de coupler tri en taille et biomarqueur-spécifique dans un même système DLD.

Conclusions et Perspectives

L'analyse de biomarqueurs en biologie médicale est un domaine en demande constante de nouvelles méthodes permettant de détecter les pathologies plus tôt, plus rapidement, plus facilement. Dans ce contexte, la biopsie liquide permet l'obtention d'un échantillon biologique rapidement et de façon peu invasive. C'est pourquoi, améliorer le diagnostic de pathologies à partir d'un échantillon de sang ou d'urine est un enjeu majeur. La mise au point de systèmes POC capables d'identifier des biomarqueurs cancéreux de façon précoce et précise permettrait de répondre à un réel besoin. Les EVs apparaissent depuis quelques années comme des biomarqueurs prometteurs. Les protéines décorant leurs membranes sont directement issues des cellules émettrices et reflètent l'état physiologique ou pathologique de ces dernières. Ainsi, les scientifiques travaillent au développement de nouvelles méthodes de diagnostic basées sur l'utilisation d'EVs pour la détection de biomarqueurs notamment dans le domaine du cancer.

La revue de la littérature, exposée dans le premier chapitre de ce manuscrit, a mis en évidence les avancées quant à la compréhension des fonctions physiologiques et pathologiques des EVs et a aussi exposé les différentes méthodes standard utilisées pour leur isolement et caractérisation. De plus, de nouvelles approches microfluidiques sont désormais disponibles pour l'isolement d'EVs à partir d'échantillon biologique et présentent des alternatives intéressantes aux méthodes conventionnelles. Cependant, cette analyse a aussi soulevé les défis à relever avant l'utilisation généralisée des EVs en diagnostic clinique. Concevoir une nouvelle méthode basée sur un système microfluidique complet alliant tri en taille et tri par affinité pour l'isolement spécifique d'EVs d'intérêt est apparu comme un objectif majeur afin de pouvoir proposer une méthode d'isolement des EVs qui puisse être reproductible et standardisable. C'est pour répondre à cette problématique que ce projet de thèse a été construit.

Ainsi, les méthodes standard d'isolement et de caractérisation ont été testées et exposées dans le second chapitre. Une connaissance solide de ces techniques a permis de mieux appréhender les enjeux liés au développement de systèmes innovants pour l'isolement spécifique d'EVs. Présentée dans le troisième chapitre de ce manuscrit, la mise au point d'une méthode ELASA pour la capture spécifique d'EVs a permis de valider le principe de capture de ces nano-objets par des aptamères. L'utilisation de ces sondes alternatives aux anticorps a l'avantage d'être moins coûteuse, moins complexe à mettre en œuvre et plus rapide que l'ELISA conventionnel. Il s'agit donc d'une méthode de capture originale et versatile permettant d'envisager le relargage contrôlé des EVs d'intérêt disposant des protéines CD63 et EpCAM, mais cela pourrait être élargi à d'autres biomarqueurs de choix.

La méthode mise au point dans le quatrième chapitre a permis de valider la capture spécifique d'EVs dans un milieu biologique complexe par l'utilisation d'aptamères supportés à l'aide de billes micrométriques. D'autre part, le développement d'un système DLD micro-ciblé optimisé a permis d'isoler les EVs d'intérêt de nombreux autres constituants biologiques. L'analyse de sous-populations vésiculaires en fonction des protéines contenues a permis, non seulement d'apporter des pistes quant à la corrélation possible entre la taille des EVs et les protéines exprimées, mais aussi une méthode de diagnostic rapide et efficace.

Avec l'objectif de réaliser un système microfluidique complet, et intégré et multiplexe, le développement d'un système de tri en taille nano-ciblé a été exposé au cinquième chapitre. Il permet de trier efficacement les EVs selon leur taille à partir d'échantillon biologique complexe en s'affranchissant de l'utilisation de

billes et permet d'avoir accès à plusieurs sous-populations d'EVs *via* la sélection de différents biomarqueurs de surface à l'aide des aptamères. Différentes optimisations restent à envisager pour atteindre des performances nécessaires à l'utilisation des EVs en clinique. Bien qu'encore exploratoire, le tri DLD nano-ciblé est une méthode passive, nécessitant un équipement restreint et automatisable avec un potentiel d'intégration dans une chaîne analytique de biologie médicale.

La suite logique de ce travail a consisté à coupler la fonction de tri biomarqueur-spécifique au système DLD nano-ciblé afin d'envisager le développement d'un outil microfluidique complet. Pour répondre à cela, la fonctionnalisation du système DLD par le développement d'une stratégie de chimie de surface a été présentée au sixième chapitre. Différentes approches ont été testées et ont permis de mettre au point une stratégie de silanisation en phase vapeur pour la fonctionnalisation de puces DLD à partir de séquences oligonucléotides modèles. L'utilisation de plusieurs aptamères en parallèle pour apporter une fonction multiplexe au système est apparue nécessaire. L'approche a été concrétisée par la fonctionnalisation de composants DLD par un silane photoactivable déposable en phase vapeur et permettant le greffage localisé des aptamères directement dans le système DLD nano-ciblé. Cette méthode, facile à réaliser à grande échelle, a permis de démontrer la faisabilité de localiser des sondes aptamères le long du canal DLD. Les résultats préliminaires de cette combinaison des deux fonctions dans un même système sont prometteurs en vue du développement d'un dispositif reproductible et standardisable en milieu clinique.

Finalement, les résultats majeurs obtenus grâce à ce projet de thèse sont résumés dans la *Figure 7.1*.

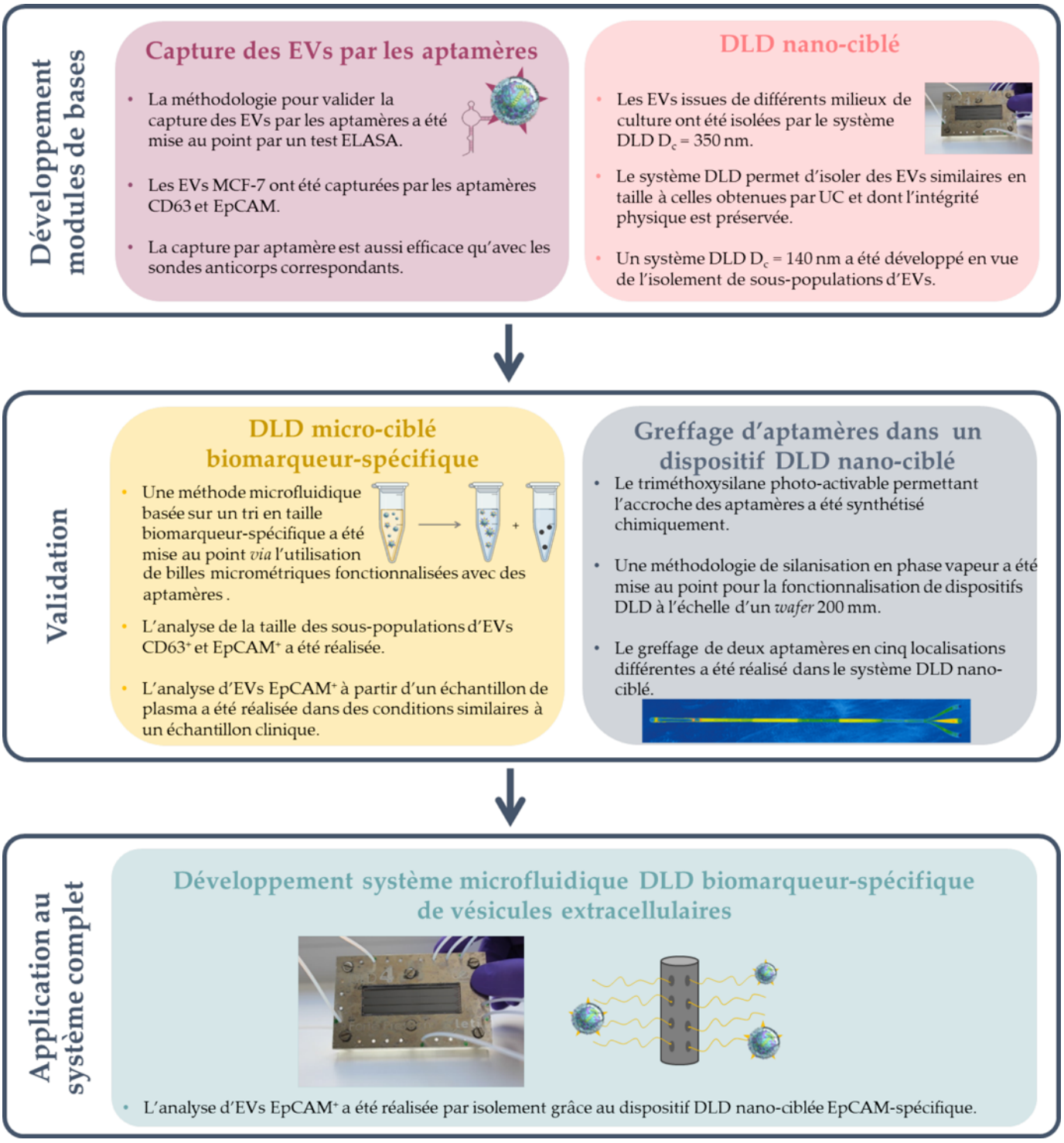


Figure 7.1 : Synthèse des résultats majeurs obtenus dans ce projet de thèse.

De nombreuses pistes restent encore à explorer. Six perspectives différentes apparaissent intéressantes et possibles à mener dans la continuité de ce travail de thèse.

D'un point de vue technologique, la mise en série pourrait être traité au niveau du système DLD global. En effet, actuellement, le CEA Leti dispose de différentes briques technologiques distinctes pour le retrait de différents types de cellules sanguines (5 à 15 µm), l'isolement de bactéries (1 à 2 µm) et d'EVs (50 à 300 nm). Isoler un échantillon d'EVs à partir d'un échantillon de sang total nécessite donc l'intervention importante d'un expérimentateur pour successivement retirer les différents types cellulaires avant le tri précis d'EVs dans le système DLD nano-ciblé. Un travail d'intégration microfluidique en interne pourrait être réalisé de façon à disposer de plusieurs composants DLD avec différents D_c au sein d'une même carte fluidique. Ainsi, à partir d'une goutte de sang, l'isolement d'EVs serait entièrement automatisé.

Un second aspect pourrait consister à travailler sur l'intégration de la fonction tri par affinité par greffage d'aptamères à l'échelle du *wafer* permettrait d'envisager une plus grande reproductibilité et un plus fort potentiel d'industrialisation futur. En effet, aujourd'hui, seule l'étape de fonctionnalisation par le silane photoactivable est réalisée à l'échelle du *wafer* par phase vapeur au regard des contraintes de microfabrication. Il serait souhaitable d'intégrer la fonction biomarqueur-spécifique avant l'étape de scellement du substrat verre au substrat silicium du composant DLD : une collaboration avec des experts des procédés de collage dans les systèmes silicium pourrait être envisagée pour travailler au développement de procédés compatibles (notamment en température) avec la fonctionnalisation de surface *via* des aptamères.

Une perspective d'amélioration des systèmes DLD nano-ciblé pour le tri des sous-populations d'EVs consisterait à poursuivre l'automatisation et à développer la parallélisation des composants DLD pour affiner le tri en taille et permettre de traiter des volumes d'échantillon plus importants en un temps plus court. Cette perspective pourrait permettre le développement de collaboration avec des biologistes désireux de comprendre les mécanismes de sécrétion des EVs et leurs rôles dans la communication cellulaire physiologique et pathologique.

D'un point de vue de biologiste, travailler sur l'efficacité de la capture des EVs par les aptamères en densifiant les sondes pourrait être une approche intéressante. Cela a déjà été envisagé par l'équipe de Chaoyong Yang par la conception de nanostructures d'ADN comportant chacune plusieurs aptamères. Cette stratégie, où chaque cellule est capturée par plusieurs aptamères ciblant des biomarqueurs membranaires spécifiques, a permis d'augmenter la capacité de capture de plus de 260%[283]. Cette approche serait réalisable à court terme en bénéficiant des compétences détenues par le SyMMES CREAB.

De plus, l'utilisation d'un plus grand nombre de sondes aptamères permettrait l'analyse multiplexe des biomarqueurs des EVs. Des aptamères ciblant d'autres biomarqueurs cancéreux tels que HER-2 et PSMA par exemple pourraient être testés dans un premier temps. En collaboration avec une équipe de cliniciens, de nouveaux marqueurs de choix pourraient être définis. En réalisant une sélection SELEX des aptamères correspondants, les EVs pourraient être isolées spécifiquement par le système DLD nano-ciblé fonctionnalisé. Cette perspective nécessite la collaboration avec une équipe de médecins ayant un besoin particulier concernant des biomarqueurs analysables à partir d'un échantillon d'EVs issues d'une biopsie liquide.

Un dernier volet particulièrement prometteur serait le développement en parallèle de dispositifs DLD pour l'isolement spécifique de CTCs et d'EVs par le biomarqueur cancéreux EpCAM par exemple. En effet, ces deux types de bio-objets, bien que différents en taille et en concentration dans les liquides biologiques, sont prometteurs pour le diagnostic de cancers. L'équipe de Mehmet Toner a déjà démontré l'intérêt de disposer d'un système fluidique biomarqueur-spécifique pour l'analyse de CTCs[411]. Cependant, les CTCs sont souvent détectées à un stade relativement avancé de la maladie. Les EVs disposent alors d'un fort potentiel pour un diagnostic plus précoce. Ainsi, disposer de deux systèmes DLD biomarqueur-spécifique permettrait d'isoler spécifiquement les CTCs et les EVs comportant la protéine EpCAM. Effectuer cette analyse à partir de différents échantillons de sang à différents stades de la maladie pourrait permettre de mettre en avant des corrélations intéressantes entre l'expression de la protéine EpCAM, des types d'objets biologiques analysés, du stade d'évolution du cancer ou de l'efficacité de l'approche thérapeutique. *In fine*, une meilleure compréhension du développement de la maladie pourrait être acquise et ainsi un suivi plus précis du cancer pourrait être mené en fonction du stade rencontré.

Finalement, le développement de systèmes microfluidiques pour l'isolement d'EVs est une thématique promettant de belles avancées scientifiques, comme encore très récemment rapporté par Hassanpour Tamrin et ses collaborateurs[412], afin d'apporter des diagnostics plus précoces et plus fiables dans les années à venir.

Bibliographie

1. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
2. Eguchi, A., Kostallari, E., Feldstein, A. E. & Shah, V. H. Extracellular vesicles, the liquid biopsy of the future. *J. Hepatol.* **70**, 1292–1294 (2019).
3. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
4. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H.-J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab. Chip* **17**, 3558–3577 (2017).
5. Smith, J. T. *et al.* Integrated nanoscale deterministic lateral displacement arrays for separation of extracellular vesicles from clinically-relevant volumes of biological samples. *Lab. Chip* **18**, 3913–3925 (2018).
6. Jin, D. *et al.* ExoAPP: Exosome-Oriented, Aptamer Nanoprobe-Enabled Surface Proteins Profiling and Detection. *Anal. Chem.* **90**, 14402–14411 (2018).
7. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 27066 (2015).
8. Chargaff, E. & West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* **166**, 189–197 (1946).
9. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* **13**, 269–288 (1967).
10. Pan, B.-T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
11. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
12. Tatischeff, I. *et al.* Dictyostelium discoideum cells shed vesicles with associated DNA and vital stain Hoechst 33342. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **54**, 476–487 (1998).
13. Rodrigues, M. L. *et al.* Vesicular Polysaccharide Export in Cryptococcus neoformans Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. *Eukaryot. Cell* **6**, 48–59 (2007).
14. Regente, M. *et al.* Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins. *FEBS Lett.* **583**, 3363–3366 (2009).
15. Knox, K. W., Vesk, M. & Work, E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **92**, 1206–1217 (1966).
16. Lee, E.-Y. *et al.* Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. *Proteomics* **9**, 5425–5436 (2009).

17. Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J.-M. & Forterre, P. Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Res. Microbiol.* **159**, 390–399 (2008).

18. Thakur, B. K. *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* **24**, 766–769 (2014).

19. Ratajczak, J. *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* **20**, 847–856 (2006).

20. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).

21. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476 (2008).

22. Lai, C. P. *et al.* Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nat. Commun.* **6**, (2015).

23. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V. & Agnati, L. F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J. Neural Transm.* **117**, 1–4 (2010).

24. Balaj, L. *et al.* Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* **2**, (2011).

25. Kahlert, C. *et al.* Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated *KRAS* and *p53* DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *J. Biol. Chem.* **289**, 3869–3875 (2014).

26. Gaillard, M. *et al.* Biosensing extracellular vesicles: contribution of biomolecules in affinity-based methods for detection and isolation. *The Analyst* **145**, 1997–2013 (2020).

27. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).

28. Llorente, A., van Deurs, B. & Sandvig, K. Cholesterol regulates prostasome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *Eur. J. Cell Biol.* **86**, 405–415 (2007).

29. Laulagnier, K. *et al.* Mast cell-and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* **380**, 161–171 (2004).

30. Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 34211–34222 (2009).

31. Kooijmans, S. A. A., Gitz-Francois, J. J. J. M., Schiffelers, R. M. & Vader, P. Recombinant phosphatidylserine-binding nanobodies for targeting of extracellular vesicles to tumor cells: a plug-and-play approach. *Nanoscale* **10**, 2413–2426 (2018).

32. Smyth, T. J., Redzic, J. S., Graner, M. W. & Anchordoquy, T. J. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 2954–2965 (2014).

33. Fitzner, D. *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* **124**, 447–458 (2011).

34. Edgar, J. R. Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol.* **14**, (2016).

35. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 421 (2012).

36. Segura, E. *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* **106**, 216–223 (2005).

37. Kilpinen, L. *et al.* Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 21927 (2013).

38. Demory Beckler, M. *et al.* Proteomic Analysis of Exosomes from Mutant KRAS Colon Cancer Cells Identifies Intercellular Transfer of Mutant KRAS. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 343–355 (2013).

39. Tauro, B. J. *et al.* Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2148–2159 (2013).

40. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593 (2009).

41. Pan, B.-T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 942–948 (1985).

42. Théry, C. *et al.* Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* **166**, 7309–7318 (2001).

43. Keerthikumar, S. *et al.* Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* **6**, 15375 (2015).

44. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* **73**, 1907–1920 (2010).

45. Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E968–E977 (2016).

46. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **30**, 3.22.1-3.22.29 (2006).

47. Paulaitis, M., Agarwal, K. & Nana-Sinkam, P. Dynamic Scaling of Exosome Sizes. *Langmuir* **34**, 9387–9393 (2018).

48. van der Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L. & Nieuwland, R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 48–56 (2016).

49. Montecalvo, A. *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **119**, 756–766 (2012).

50. EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 347–357 (2013).

51. Gatti, S. *et al.* Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 1474–1483 (2011).

52. del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. & López, J. A. Tissue-factor–bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**, 1604–1611 (2005).

53. Pariset, E. Development of a microfluidic device based on Deterministic Lateral Displacement (DLD) for biological sample preparation, towards the extraction of extracellular vesicles. (Université Grenoble Alpes, 2018).

54. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).

55. Rhee, J.-S. *et al.* The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **92**, 394–402 (2004).

56. Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1143–1149 (2009).

57. Wolfers, J. *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* **7**, 297–303 (2001).

58. Giri, P. K. & Schorey, J. S. Exosomes Derived from M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* **3**, (2008).

59. Walker, J. D., Maier, C. L. & Pober, J. S. Cytomegalovirus-Infected Human Endothelial Cells Can Stimulate Allogeneic CD4 $^{+}$ Memory T Cells by Releasing Antigenic Exosomes. *J. Immunol.* **182**, 1548–1559 (2009).

60. Luketic, L. *et al.* Antigen Presentation by Exosomes Released from Peptide-Pulsed Dendritic Cells Is not Suppressed by the Presence of Active CTL. *J. Immunol.* **179**, 5024–5032 (2007).

61. Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M. & Minami, M. MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol. Lett.* **89**, 125–131 (2003).

62. Admyre, C., Johansson, S. M., Paulie, S. & Gabrielsson, S. Direct exosome stimulation of peripheral humanT cells detected by ELISPOT. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1772–1781 (2006).

63. Chaput, N. *et al.* Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. II. Exosomes in CpG Adjuvants Efficiently Prime Naive Tc1 Lymphocytes Leading to Tumor Rejection. *J. Immunol.* **172**, 2137–2146 (2004).

64. Théry, C. *et al.* Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell–derived exosomes. *Nat. Immunol.* **3**, 1156–1162 (2002).

65. Skokos, D. *et al.* Mast Cell-Derived Exosomes Induce Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells and Elicit Specific Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* **170**, 3037–3045 (2003).

66. Klibi, J. *et al.* Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9–containing exosomes released by Epstein-Barr virus–infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **113**, 1957–1966 (2009).

67. Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res.* **67**, 7458–7466 (2007).

68. Liu, C. *et al.* Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. *J. Immunol.* **176**, 1375–1385 (2006).

69. Yu, S. *et al.* Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *J. Immunol.* **178**, 6867–6875 (2007).

70. Xiang, X. *et al.* Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int. J. Cancer* **124**, 2621–2633 (2009).

71. Pêche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S. & Cuturi, M. C. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection1: *Transplantation* **76**, 1503–1510 (2003).

72. Kim, S. H., Bianco, N. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E. & Robbins, P. D. Effective Treatment of Inflammatory Disease Models with Exosomes Derived from Dendritic Cells Genetically Modified to Express IL-4. *J. Immunol.* **179**, 2242–2249 (2007).

73. Prado, N. *et al.* Exosomes from Bronchoalveolar Fluid of Tolerized Mice Prevent Allergic Reaction. *J. Immunol.* **181**, 1519–1525 (2008).

74. Quesenberry, P. J. & Aliotta, J. M. The Paradoxical Dynamism of Marrow Stem Cells: Considerations of Stem Cells, Niches, and Microvesicles. *Stem Cell Rev.* **4**, 137–147 (2008).

75. Thompson, A. G. *et al.* Extracellular vesicles in neurodegenerative disease — pathogenesis to biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 346–357 (2016).

76. Janas, A. M., Sapoń, K., Janas, T., Stowell, M. H. B. & Janas, T. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1858**, 1139–1151 (2016).

77. Zhang, B. *et al.* Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *neuron* **21**, 1465–1475 (1998).

78. Jahn, R. & Fasshauer, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207 (2012).

79. Fauré, J. *et al.* Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 642–648 (2006).

80. Budnik, V., Ruiz-Cañada, C. & Wendler, F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 160–172 (2016).

81. Escudero, C. A. *et al.* The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *J. Cell Sci.* **127**, 1966–1979 (2014).

82. Liquid Biopsy: Using Tumor DNA in Blood to Aid Cancer Care - National Cancer Institute. https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/liquid-biopsy-detects-treats-cancer (2017).

83. Bibette, J. & Taly, V. Biopsie liquide : pour détecter les maladies plus rapidement. *Santé 2030 - Fréquence Médicale* (2019).

84. Gerlinger, M., Swanton, C. & Rowan, A. Impact of intra-individual molecular heterogeneity in personalized treatment of hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).

85. Panagiotara, A., Markou, A., Lianidou, E. S., Patrinos, G. P. & Katsila, T. Exosomes: A Cancer Theranostics Road Map. *Public Health Genomics* **20**, 116–125 (2017).

86. Steuber, T., O'Brien, M. F. & Lilja, H. Serum Markers for Prostate Cancer: A Rational Approach to the Literature. *Eur. Urol.* **54**, 31–40 (2008).

87. Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D. & Ryan, W. L. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLOS ONE* **12**, e0183915 (2017).

88. Hou, H. W. *et al.* Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci. Rep.* **3**, (2013).

89. Guo, L. & He, B. Extracellular vesicles and their diagnostic and prognostic potential in cancer. *Transl. Cancer Res.* **6**, 599–612 (2017).

90. Tkach, M. & Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232 (2016).

91. Kanada, M., Bachmann, M. H. & Contag, C. H. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends Cancer* **2**, 84–94 (2016).

92. Suchorska, W. M. & Lach, M. S. The role of exosomes in tumor progression and metastasis (Review). *Oncol. Rep.* **35**, 1237–1244 (2016).

93. Tatischeff, I. Cell-derived Extracellular Vesicles Open New Perspectives for Cancer Research. *Cancer Res. Front.* **1**, 208–224 (2015).

94. Al-Nedawi, K. *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 619–624 (2008).

95. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891 (2012).

96. Zhu, W. *et al.* Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett.* **315**, 28–37 (2012).

97. Wu, J., Qu, Z., Fei, Z.-W., Wu, J.-H. & Jiang, C.-P. Role of stem cell-derived exosomes in cancer. *Oncol. Lett.* **13**, 2855–2866 (2017).

98. Kumar, D., Gupta, D., Shankar, S. & Srivastava, R. K. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Oncotarget* **6**, 3280 (2015).

99. Le, M. T. N. *et al.* miR-200–containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 5109–5128 (2014).

100. Zomer, A. *et al.* In Vivo Imaging Reveals Extracellular Vesicle-Mediated Phenocopying of Metastatic Behavior. *Cell* **161**, 1046–1057 (2015).

101. Webber, J. *et al.* Proteomics Analysis of Cancer Exosomes Using a Novel Modified Aptamer-based Array (SOMAscan ™) Platform. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1050–1064 (2014).

102. Hoshino, D. *et al.* Exosome Secretion Is Enhanced by Invadopodia and Drives Invasive Behavior. *Cell Rep.* **5**, 1159–1168 (2013).

103. Lazar, I. *et al.* Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Res.* **76**, 4051–4057 (2016).

104. Taverna, S. *et al.* Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *Int. J. Cancer* **130**, 2033–2043 (2012).

105. Svensson, K. J. *et al.* Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2–mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13147–13152 (2011).

106. Millimaggi, D. *et al.* Tumor Vesicle—Associated CD147 Modulates the Angiogenic Capability of Endothelial Cells. *Neoplasia* **9**, 349–357 (2007).

107. Wang, J. *et al.* Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression: MM exosomes enhance angiogenesis and immunosuppression. *J. Pathol.* **239**, 162–173 (2016).

108. Tadokoro, H., Umezu, T., Ohyashiki, K., Hirano, T. & Ohyashiki, J. H. Exosomes Derived from Hypoxic Leukemia Cells Enhance Tube Formation in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 34343–34351 (2013).

109. Liang, X., Zhang, L., Wang, S., Han, Q. & Zhao, R. C. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J. Cell Sci.* **129**, 2182–2189 (2016).

110. Hood, J. L., Pan, H., Lanza, G. M. & Wickline, S. A. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab. Invest.* **89**, 1317–1328 (2009).

111. Fan, G.-C. Hypoxic exosomes promote angiogenesis. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **124**, 3669–3670 (2014).

112. Kosaka, N. Decoding the Secret of Cancer by Means of Extracellular Vesicles. *J. Clin. Med.* **5**, 22 (2016).

113. Chen, W. *et al.* Exosomes from Drug-Resistant Breast Cancer Cells Transmit Chemoresistance by a Horizontal Transfer of MicroRNAs. *PLoS ONE* **9**, e95240 (2014).

114. Richards, K. E. *et al.* Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene* **36**, 1770–1778 (2017).

115. Boelens, M. C. *et al.* Exosome Transfer from Stromal to Breast Cancer Cells Regulates Therapy Resistance Pathways. *Cell* **159**, 499–513 (2014).

116. Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T. & Rosania, G. R. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* **63**, 4331–4337 (2003).

117. Whiteside, T. L. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. in *Advances in Clinical Chemistry* vol. 74 103–141 (Elsevier, 2016).

118. Muhsin-Sharafaldine, M.-R. *et al.* Procoagulant and immunogenic properties of melanoma exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles. *Oncotarget* **7**, 56279–56294 (2016).

119. Iero, M. *et al.* Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* **15**, 80–88 (2008).

120. Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M. J., Mandapathil, M. & Whiteside, T. L. Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg). *PLoS ONE* **5**, e11469 (2010).

121. Wieckowski, E. U. *et al.* Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8 $^{+}$ T Lymphocytes. *J. Immunol.* **183**, 3720–3730 (2009).

122. Cai, G. *et al.* A Regulatory Role for IL-10 Receptor Signaling in Development and B Cell Help of T Follicular Helper Cells in Mice. *J. Immunol.* **189**, 1294–1302 (2012).

123. Condamine, T. & Gabrilovich, D. I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* **32**, 19–25 (2011).

124. Valenti, R. *et al.* Human Tumor-Released Microvesicles Promote the Differentiation of Myeloid Cells with Transforming Growth Factor-β–Mediated Suppressive Activity on T Lymphocytes. *Cancer Res.* **66**, 9290–9298 (2006).

125. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2110–E2116 (2012).

126. Ying, X. *et al.* Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* **7**, 43076 (2016).

127. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **17**, 816–826 (2015).

128. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).

129. Tominaga, N. *et al.* Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood–brain barrier. *Nat. Commun.* **6**, (2015).

130. Zhang, L. *et al.* Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* **527**, 100–104 (2015).

131. Bliss, S. A. *et al.* Mesenchymal Stem Cell–Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res.* **76**, 5832–5844 (2016).

132. Di Vizio, D. *et al.* Large Oncosomes in Human Prostate Cancer Tissues and in the Circulation of Mice with Metastatic Disease. *Am. J. Pathol.* **181**, 1573–1584 (2012).

133. Buzas, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A. & Gay, S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 356–364 (2014).

134. Bhome, R. *et al.* Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett.* **420**, 228–235 (2018).

135. Cappello, F. *et al.* Exosome levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? *Eur. J. Pharm. Sci.* **96**, 93–98 (2017).

136. Logozzi, M. *et al.* High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin-1 in Plasma of Melanoma Patients. *PLoS ONE* **4**, e5219 (2009).

137. Federici, C. *et al.* Exosome Release and Low pH Belong to a Framework of Resistance of Human Melanoma Cells to Cisplatin. *PLoS ONE* **9**, e88193 (2014).

138. Duijvesz, D. *et al.* Immuno-based detection of extracellular vesicles in urine as diagnostic marker for prostate cancer: Extracellular vesicles as marker for PCa. *Int. J. Cancer* **137**, 2869–2878 (2015).

139. Alegre, E. *et al.* Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers. *Clin. Chim. Acta* **454**, 28–32 (2016).

140. Matsumoto, Y. *et al.* Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **36**, 2535–2543 (2016).

141. Johnsen, K. B., Gudbergsson, J. M., Andresen, T. L. & Simonsen, J. B. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1871**, 109–116 (2019).

142. Shao, H. *et al.* Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nat. Commun.* **6**, 6999 (2015).

143. Zocco, D., Ferruzzi, P., Cappello, F., Kuo, W. P. & Fais, S. Extracellular Vesicles as Shuttles of Tumor Biomarkers and Anti-Tumor Drugs. *Front. Oncol.* **4**, (2014).

144. Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M. & Hill, A. F. Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases? *Front. Physiol.* **3**, (2012).

145. Cao, X.-Y. *et al.* MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci. Lett.* **644**, 94–99 (2017).

146. Miranda, A. M. *et al.* Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat. Commun.* **9**, (2018).

147. Schwab, A. *et al.* Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).

148. Marcilla, A. *et al.* Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 25040 (2014).

149. Delabranche, X., Berger, A., Boisramé-Helms, J. & Meziani, F. Microparticles and infectious diseases. *Médecine Mal. Infect.* **42**, 335–343 (2012).

150. Ellwanger, J. H., Veit, T. D. & Chies, J. A. B. Exosomes in HIV infection: A review and critical look. *Infect. Genet. Evol.* **53**, 146–154 (2017).

151. Madison, M. & Okeoma, C. Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis. *Viruses* **7**, 4093–4118 (2015).

152. Lei, H., Venkatakrishnan, A., Yu, S. & Kazlauskas, A. Protein Kinase A-dependent Translocation of Hsp90α Impairs Endothelial Nitric-oxide Synthase Activity in High Glucose and Diabetes. *J. Biol. Chem.* **282**, 9364–9371 (2007).

153. Sheng, H. *et al.* Insulinoma-Released Exosomes or Microparticles Are Immunostimulatory and Can Activate Autoreactive T Cells Spontaneously Developed in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* **187**, 1591–1600 (2011).

154. Hasilo, C. P. *et al.* Presence of diabetes autoantigens in extracellular vesicles derived from human islets. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

155. Deng, Z. -b. *et al.* Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* **58**, 2498–2505 (2009).

156. Lee, M.-J., Park, D.-H. & Kang, J.-H. Exosomes as the source of biomarkers of metabolic diseases. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **21**, 119 (2016).

157. Withrow, J. *et al.* Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, (2016).

158. Cosenza, S., Ruiz, M., Maumus, M., Jorgensen, C. & Noël, D. Pathogenic or Therapeutic Extracellular Vesicles in Rheumatic Diseases: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 889 (2017).

159. Skriner, K., Adolph, K., Jungblut, P. R. & Burmester, G. R. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum.* **54**, 3809–3814 (2006).

160. Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580–583 (2010).

161. Kurowska-Stolarska, M. *et al.* MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 11193–11198 (2011).

162. Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D. & Ritter, T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol. Ther.* **23**, 812–823 (2015).

163. De Jong, O. G., Van Balkom, B. W. M., Schiffelers, R. M., Bouten, C. V. C. & Verhaar, M. C. Extracellular Vesicles: Potential Roles in Regenerative Medicine. *Front. Immunol.* **5**, (2014).

164. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 195–208 (2014).

165. Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G. & Schiffelers, R. M. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 148–156 (2016).

166. Mizrak, A. *et al.* Genetically Engineered Microvesicles Carrying Suicide mRNA/Protein Inhibit Schwannoma Tumor Growth. *Mol. Ther.* **21**, 101–108 (2013).

167. Tang, K. *et al.* Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles. *Nat. Commun.* **3**, (2012).

168. Grangier, A. *et al.* Technological advances towards extracellular vesicles mass production. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 113843 (2021).

169. Kalra, H., Drummen, G. & Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 170 (2016).

170. Van Deun, J. *et al.* EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat. Methods* **14**, 228–232 (2017).

171. Witwer, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 20360 (2013).

172. Lötvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 26913 (2014).

173. Witwer, K. W. *et al.* Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J. Extracell. Vesicles* **6**, 1396823 (2017).

174. Momen-Heravi, F. *et al.* Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol. Chem.* **394**, 1253–1262 (2013).

175. Szatanek, R., Baran, J., Siedlar, M. & Baj-Krzyworzeka, M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int. J. Mol. Med.* **36**, 11–17 (2015).

176. Rupert, D. L. M., Claudio, V., Lässer, C. & Bally, M. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1861**, 3164–3179 (2017).

177. Crescitelli, R. *et al.* Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 20677 (2013).

178. Choi, D.-S. *et al.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics* **11**, 2745–2751 (2011).

179. Willms, E. *et al.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci. Rep.* **6**, (2016).

180. Van Deun, J. *et al.* The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 24858 (2014).

181. Böing, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 23430 (2014).

182. Lobb, R. J. *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 27031 (2015).

183. Baranyai, T. *et al.* Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLOS ONE* **10**, e0145686 (2015).

184. Gámez-Valero, A. *et al.* Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci. Rep.* **6**, (2016).

185. Mol, E. A., Goumans, M.-J., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G. & Vader, P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **13**, 2061–2065 (2017).

186. Takov, K., Yellon, D. M. & Davidson, S. M. Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J. Extracell. Vesicles* **8**, 1560809 (2019).

187. Sáenz-Cuesta, M. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front. Immunol.* **6**, (2015).

188. Vanni, I., Alama, A., Grossi, F., Dal Bello, M. G. & Coco, S. Exosomes: a new horizon in lung cancer. *Drug Discov. Today* **22**, 927–936 (2017).

189. Brownlee, Z., Lynn, K. D., Thorpe, P. E. & Schroit, A. J. A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J. Immunol. Methods* **407**, 120–126 (2014).

190. Gallart-Palau, X. *et al.* Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PRotein Organic Solvent PRecipitation (PROSPR). *Sci. Rep.* **5**, (2015).

191. Kordelas, L. *et al.* MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* **28**, 970–973 (2014).

192. Van Der Pol, E. *et al.* Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes: Detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2596–2607 (2010).

193. Ito, T., Sun, L., Henriquez, R. R. & Crooks, R. M. A carbon nanotube-based Coulter nanoparticle counter. *Acc. Chem. Res.* **37**, 937–945 (2004).

194. Maas, S. L. N. *et al.* Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *J. Controlled Release* **200**, 87–96 (2015).

195. Vogel, R. *et al.* Quantitative Sizing of Nano/Microparticles with a Tunable Elastomeric Pore Sensor. *Anal. Chem.* **83**, 3499–3506 (2011).

196. Anderson, W., Lane, R., Korbie, D. & Trau, M. Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability. *Langmuir* **31**, 6577–6587 (2015).

197. Kozak, D. *et al.* Simultaneous Size and ζ-Potential Measurements of Individual Nanoparticles in Dispersion Using Size-Tunable Pore Sensors. *ACS Nano* **6**, 6990–6997 (2012).

198. Akers, J. C. *et al.* Comparative Analysis of Technologies for Quantifying Extracellular Vesicles (EVs) in Clinical Cerebrospinal Fluids (CSF). *PLOS ONE* **11**, e0149866 (2016).

199. György, B. *et al.* Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* **117**, e39–e48 (2011).

200. Issman, L., Brenner, B., Talmon, Y. & Aharon, A. Cryogenic Transmission Electron Microscopy Nanostructural Study of Shed Microparticles. *PLoS ONE* **8**, e83680 (2013).

201. Melo, S. A. *et al.* Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–721 (2014).

202. Sharma, S., Das, K., Woo, J. & Gimzewski, J. K. Nanofilaments on glioblastoma exosomes revealed by peak force microscopy. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20131150 (2014).

203. Hartjes, T., Mytnyk, S., Jenster, G., van Steijn, V. & van Royen, M. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering* **6**, 7 (2019).

204. Chiang, C. & Chen, C. Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level. *J. Biomed. Sci.* **26**, (2019).

205. Yuana, Y. *et al.* Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 315–323 (2010).

206. Hardij, J. *et al.* Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: comparison of air-tapping-mode AFM and liquid Peak Force AFM. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 21045 (2013).

207. Whitehead, B. *et al.* Tumour exosomes display differential mechanical and complement activation properties dependent on malignant state: implications in endothelial leakiness. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 29685 (2015).

208. Burg, T. P. *et al.* Vacuum-Packaged Suspended Microchannel Resonant Mass Sensor for Biomolecular Detection. *J. Microelectromechanical Syst.* **15**, 1466–1476 (2006).

209. Cetin, A. E. *et al.* Determining therapeutic susceptibility in multiple myeloma by single-cell mass accumulation. *Nat. Commun.* **8**, (2017).

210. Stevens, M. M. *et al.* Drug sensitivity of single cancer cells is predicted by changes in mass accumulation rate. *Nat. Biotechnol.* **34**, 1161–1167 (2016).

211. Cermak, N. *et al.* High-throughput measurement of single-cell growth rates using serial microfluidic mass sensor arrays. *Nat. Biotechnol.* **34**, 1052–1059 (2016).

212. Kimmerling, R. J. *et al.* A microfluidic platform enabling single-cell RNA-seq of multigenerational lineages. *Nat. Commun.* **7**, (2016).

213. Shaw Bagnall, J. *et al.* Deformability-based cell selection with downstream immunofluorescence analysis. *Integr. Biol.* **8**, 654–664 (2016).

214. Olcum, S. *et al.* Weighing nanoparticles in solution at the attogram scale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1310–1315 (2014).

215. Agache, V., Blanco-Gomez, G., Baleras, F. & Caillat, P. An embedded microchannel in a MEMS plate resonator for ultrasensitive mass sensing in liquid. *Lab. Chip* **11**, 2598 (2011).

216. Hadji, C. *et al.* Hollow MEMS mass sensors for real-time particles weighing and sizing from a few 10 nm to the μm scale. in *2015 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)* 180–183 (IEEE, 2015).

217. Gagino, M. *et al.* Suspended Nanochannel Resonator Arrays with Piezoresistive Sensors for High-Throughput Weighing of Nanoparticles in Solution. *ACS Sens.* **5**, 1230–1238 (2020).

218. Burg, T. P. *et al.* Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* **446**, 1066–1069 (2007).

219. Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 106–112 (2003).

220. Hemler, M. E. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* **155**, 1103–1108 (2001).

221. Hemler, M. E. Targeting of tetraspanin proteins—potential benefits and strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 747–758 (2008).

222. Théry, C. *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* **147**, 599–610 (1999).

223. Pols, M. S. & Klumperman, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* **315**, 1584–1592 (2009).

224. Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. & Geuze, H. J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 20121–20127 (1998).

225. Zhu, L. *et al.* Label-Free Quantitative Detection of Tumor-Derived Exosomes through Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem.* **86**, 8857–8864 (2014).

226. Daaboul, G. G. *et al.* Digital Detection of Exosomes by Interferometric Imaging. *Sci. Rep.* **6**, 37246 (2016).

227. Chen, C. *et al.* Paper-based immunoaffinity devices for accessible isolation and characterization of extracellular vesicles. *Microfluid. Nanofluidics* **16**, 849–856 (2014).

228. Koliha, N. *et al.* A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **5**, UNSP 29975 (2016).

229. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* **5**, 442 (2014).

230. Winter, J. M., Yeo, C. J. & Brody, J. R. Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer: Biomarkers in Pancreatic Cancer. *J. Surg. Oncol.* **107**, 15–22 (2013).

231. Munz, M., Baeuerle, P. A. & Gires, O. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Res.* **69**, 5627–5629 (2009).

232. Misek, D. E. & Kim, E. H. Protein Biomarkers for the Early Detection of Breast Cancer. *Int. J. Proteomics* **2011**, 1–9 (2011).

233. Zamay, T. *et al.* Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers* **9**, 155 (2017).

234. Boriachek, K. *et al.* Quantum dot-based sensitive detection of disease specific exosome in serum. *Analyst* **142**, 2211–2219 (2017).

235. He, M., Crow, J., Roth, M., Zeng, Y. & Godwin, A. K. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab. Chip* **14**, 3773–3780 (2014).

236. Llorente, A. *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 1302–1309 (2013).

237. Record, M., Carayon, K., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 108–120 (2014).

238. Haraszti, R. A. *et al.* High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* **5**, 32570 (2016).

239. Varon, D. & Shai, E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J. Thromb. Haemost.* **13**, S40–S46 (2015).

240. Tamura, R. & Yin, H. Chapter Two - Rationally Designed Peptide Probes for Extracellular Vesicles. in *Advances in Clinical Chemistry* (ed. Makowski, G. S.) vol. 79 25–41 (Elsevier, 2017).

241. Saludes, J. P. *et al.* Detection of Highly Curved Membrane Surfaces Using a Cyclic Peptide Derived from Synaptotagmin-I. *Acs Chem. Biol.* **7**, 1629–1635 (2012).

242. P. Saludes, J. *et al.* Multivalency amplifies the selection and affinity of bradykinin-derived peptides for lipid nanovesicles. *Mol. Biosyst.* **9**, 2005–2009 (2013).

243. Morton, L. A. *et al.* MARCKS-ED Peptide as a Curvature and Lipid Sensor. *ACS Chem. Biol.* **8**, 218–225 (2013).

244. Hosseinkhani, B. *et al.* Direct detection of nano-scale extracellular vesicles derived from inflammation-triggered endothelial cells using surface plasmon resonance. *Nanomedicine-Nanotechnol. Biol. Med.* **13**, 1663–1671 (2017).

245. Ghosh, A. *et al.* Rapid Isolation of Extracellular Vesicles from Cell Culture and Biological Fluids Using a Synthetic Peptide with Specific Affinity for Heat Shock Proteins. *Plos One* **9**, e110443 (2014).

246. Knol, J. C. *et al.* Peptide-mediated 'miniprep' isolation of extracellular vesicles is suitable for high-throughput proteomics. *EuPA Open Proteomics* **11**, 11–15 (2016).

247. Bijnsdorp, I. V. *et al.* Feasibility of urinary extracellular vesicle proteome profiling using a robust and simple, clinically applicable isolation method. *J. Extracell. Vesicles* **6**, (2017).

248. Joy, A. P. *et al.* Proteome profiling of extracellular vesicles captured with the affinity peptide Vn96: comparison of Laemmli and TRIzol© protein-extraction methods. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1438727 (2018).

249. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* **4**, 2980 (2013).

250. Shao, H. *et al.* New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem. Rev.* **118**, 1917–1950 (2018).

251. Russo, F. *et al.* miRandola: Extracellular Circulating MicroRNAs Database. *PLoS ONE* **7**, e47786 (2012).

252. Yoshioka, Y. *et al.* Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.* **5**, (2014).

253. Zarovni, N. *et al.* Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods* **87**, 46–58 (2015).

254. Liang, K. *et al.* Nanoplasmonic quantification of tumour-derived extracellular vesicles in plasma microsamples for diagnosis and treatment monitoring. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, (2017).

255. Woo, H.-K. *et al.* Exodisc for Rapid, Size-Selective, and Efficient Isolation and Analysis of Nanoscale Extracellular Vesicles from Biological Samples. *ACS Nano* **11**, 1360–1370 (2017).

256. Zhou, Q. *et al.* Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes. *Methods* **97**, 88–93 (2016).

257. Zhang, H., Wang, Z., Zhang, Q., Wang, F. & Liu, Y. Ti3C2 MXenes nanosheets catalyzed highly efficient electrogenerated chemiluminescence biosensor for the detection of exosomes. *Biosens. Bioelectron.* **124–125**, 184–190 (2019).

258. Xia, Y. *et al.* A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled carbon nanotubes for detection of exosomes. *Biosens. Bioelectron.* **92**, 8–15 (2017).

259. https://www.univ-reims.fr/urcacyt/urcacyt-plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html.

260. van der Vlist, E. J., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G. J. A. & Wauben, M. H. M. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat. Protoc.* **7**, 1311–1326 (2012).

261. Aass, H. C. D. *et al.* Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytometry A* **79A**, 990–999 (2011).

262. Stoner, S. A. *et al.* High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles: Vesicle Flow Cytometry. *Cytometry A* **89**, 196–206 (2016).

263. van der Pol, E. *et al.* Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1182–1192 (2014).

264. Van Der POL, E., Van GEMERT, M. J. C., Sturk, A., Nieuwland, R. & Van LEEUWEN, T. G. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry: Detection of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 919–930 (2012).

265. Welsh, J. A. *et al.* MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. *J. Extracell. Vesicles* **9**, 1713526 (2020).

266. Ueda, K. *et al.* Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci. Rep.* **4**, (2015).

267. Rekker, K. *et al.* Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clin. Biochem.* **47**, 135–138 (2014).

268. Karimi, N. *et al.* Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2873–2886 (2018).

269. Xie, H. *et al.* Extracellular vesicles based electrochemical biosensors for detection of cancer cells: A review. *Chin. Chem. Lett.* **31**, 1737–1745 (2020).

270. Shao, B. & Xiao, Z. Recent achievements in exosomal biomarkers detection by nanomaterials-based optical biosensors - A review. *Anal. Chim. Acta* **1114**, 74–84 (2020).

271. Hisey, C. L., Dorayappan, K. D. P., Cohn, D. E., Selvendiran, K. & Hansford, D. J. Microfluidic affinity separation chip for selective capture and release of label-free ovarian cancer exosomes. *Lab. Chip* **18**, 3144–3153 (2018).

272. Qi, R. *et al.* Microfluidic device for the analysis of MDR cancerous cell-derived exosomes' response to nanotherapy. *Biomed. Microdevices* **21**, (2019).

273. Wang, Y., Yuan, W., Kimber, M., Lu, M. & Dong, L. Rapid Differentiation of Host and Parasitic Exosome Vesicles Using Microfluidic Photonic Crystal Biosensor. *Acs Sens.* **3**, 1616–1621 (2018).

274. Reátegui, E. *et al.* Engineered nanointerfaces for microfluidic isolation and molecular profiling of tumor-specific extracellular vesicles. *Nat. Commun.* **9**, (2018).

275. Dudani, J. S. *et al.* Rapid inertial solution exchange for enrichment and flow cytometric detection of microvesicles. *Biomicrofluidics* **9**, (2015).

276. Qiu, G. *et al.* Detection of Glioma-Derived Exosomes with the Biotinylated Antibody-Functionalized Titanium Nitride Plasmonic Biosensor. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1806761 (2019).

277. Im, H. *et al.* Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat. Biotechnol.* **32**, 490–495 (2014).

278. Kilic, T., Valinhas, A. T. D. S., Wall, I., Renaud, P. & Carrara, S. Label-free detection of hypoxia-induced extracellular vesicle secretion from MCF-7 cells. *Sci. Rep.* **8**, 9402 (2018).

279. Cavallaro, S. *et al.* Label-Free Surface Protein Profiling of Extracellular Vesicles by an Electrokinetic Sensor. *ACS Sens.* **4**, 1399–1408 (2019).

280. Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A. & Nieuwland, R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 23262 (2014).

281. Dahotre, S. N., Chang, Y. M., Wieland, A., Stammen, S. R. & Kwong, G. A. Individually addressable and dynamic DNA gates for multiplexed cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 4357–4362 (2018).

282. Simmel, F. C., Yurke, B. & Singh, H. R. Principles and Applications of Nucleic Acid Strand Displacement Reactions. *Chem. Rev.* (2019).

283. Zhang, H. *et al.* HUNTER-Chip: Bioinspired Hierarchically Aptamer Structure-Based Circulating Fetal Cell Isolation for Non-Invasive Prenatal Testing. *Anal. Chem.* **93**, 7235–7241 (2021).

284. Pandey, C. M. *et al.* Microfluidics Based Point-of-Care Diagnostics. *Biotechnol. J.* **13**, 1700047 (2018).

285. Sachdeva, S., Davis, R. W. & Saha, A. K. Microfluidic Point-of-Care Testing: Commercial Landscape and Future Directions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 602659 (2021).

286. Maeki, M., Kimura, N., Sato, Y., Harashima, H. & Tokeshi, M. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **128**, 84–100 (2018).

287. Sunkara, V., Woo, H.-K. & Cho, Y.-K. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *The Analyst* **141**, 371–381 (2016).

288. Yang, F., Liao, X., Tian, Y. & Li, G. Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies. *Biotechnol. J.* **12**, 1600699 (2017).

289. Gholizadeh, S. *et al.* Microfluidic approaches for isolation, detection, and characterization of extracellular vesicles: Current status and future directions. *Biosens. Bioelectron.* **91**, 588–605 (2017).

290. Kang, H., Kim, J. & Park, J. Methods to isolate extracellular vesicles for diagnosis. *Micro Nano Syst. Lett.* **5**, (2017).

291. Lu, J. *et al.* Application of Microfluidic Chips in Separation and Analysis of Extracellular Vesicles in Liquid Biopsy for Cancer. *Micromachines* **10**, 390 (2019).

292. Chen, C. *et al.* Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab. Chip* **10**, 505–511 (2010).

293. Han, B. H. *et al.* Isolation of extracellular vesicles from small volumes of plasma using a microfluidic aqueous two-phase system. *Lab. Chip* **20**, 3552–3559 (2020).

294. Sitar, S. *et al.* Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation. *Anal. Chem.* **87**, 9225–9233 (2015).

295. Wu, M. *et al.* Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 10584–10589 (2017).

296. Lee, K., Shao, H., Weissleder, R. & Lee, H. Acoustic Purification of Extracellular Microvesicles. *ACS Nano* **9**, 2321–2327 (2015).

297. Rezeli, M. *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Isolated by Acoustic Trapping or Differential Centrifugation. *Anal. Chem.* **88**, 8577–8586 (2016).

298. Ku, A. *et al.* Acoustic Enrichment of Extracellular Vesicles from Biological Fluids. *Anal. Chem.* **90**, 8011–8019 (2018).

299. Wang, Z. *et al.* Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab. Chip* **13**, 2879 (2013).

300. Wunsch, B. H. *et al.* Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm. *Nat. Nanotechnol.* **11**, 936–940 (2016).

301. Huang, L. R. Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement. *Science* **304**, 987–990 (2004).

302. Davis, J. A. *et al.* Deterministic hydrodynamics: taking blood apart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14779–14784 (2006).

303. Inglis, D. W., Davis, J. A., Austin, R. H. & Sturm, J. C. Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement. *Lab. Chip* **6**, 655–658 (2006).

304. Davis, J. A. Microfluidic Separation of Blood Components through Deterministic Lateral Displacement. (Princeton University, 2008).

305. Kim, S.-C. *et al.* Broken flow symmetry explains the dynamics of small particles in deterministic lateral displacement arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201706645 (2017) doi:10.1073/pnas.1706645114.

306. Au, S. H. *et al.* Microfluidic Isolation of Circulating Tumor Cell Clusters by Size and Asymmetry. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).

307. Pariset, E. *et al.* Separation of Biological Particles in a Modular Platform of Cascaded Deterministic Lateral Displacement Modules. *Sci. Rep.* **8**, (2018).

308. Beech, J. P. *et al.* Separation of pathogenic bacteria by chain length. *Anal. Chim. Acta* **1000**, 223–231 (2018).

309. Pariset, E. Development of a microfluidic device based on Deterministic Lateral Displacement (DLD) for biological sample preparation, towards the extraction of extracellular vesicles. (2018).

310. Holm, S. H., Beech, J. P., Barrett, M. P. & Tegenfeldt, J. O. Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement. *Lab. Chip* **11**, 1326 (2011).

311. Inglis, D. W., Herman, N. & Vesey, G. Highly accurate deterministic lateral displacement device and its application to purification of fungal spores. *Biomicrofluidics* **4**, 024109 (2010).

312. Tran, T. S. H., Ho, B. D., Beech, J. P. & Tegenfeldt, J. O. Open channel deterministic lateral displacement for particle and cell sorting. *Lab. Chip* **17**, 3592–3600 (2017).

313. Feng, S., Skelley, A. M., Anwer, A. G., Liu, G. & Inglis, D. W. Maximizing particle concentration in deterministic lateral displacement arrays. *Biomicrofluidics* **11**, 024121 (2017).

314. Ranjan, S., Zeming, K. K., Jureen, R., Fisher, D. & Zhang, Y. DLD pillar shape design for efficient separation of spherical and non-spherical bioparticles. *Lab. Chip* **14**, 4250–4262 (2014).

315. Loutherback, K. *et al.* Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min. *AIP Adv.* **2**, 042107 (2012).

316. Hyun, J., Hyun, J., Wang, S. & Yang, S. Improved pillar shape for deterministic lateral displacement separation method to maintain separation efficiency over a long period of time. *Sep. Purif. Technol.* **172**, 258–267 (2017).

317. Pariset, E. *et al.* Anticipating Cutoff Diameters in Deterministic Lateral Displacement (DLD) Microfluidic Devices for an Optimized Particle Separation. *Small* **13**, 1701901 (2017).

318. Du, S., Shojaei-Zadeh, S. & Drazer, G. Liquid-based stationary phase for deterministic lateral displacement separation in microfluidics. *Soft Matter* **13**, 7649–7656 (2017).

319. Beech, J. P., Jönsson, P. & Tegenfeldt, J. O. Tipping the balance of deterministic lateral displacement devices using dielectrophoresis. *Lab. Chip* **9**, 2698 (2009).

320. Zeming, K. K., Thakor, N. V., Zhang, Y. & Chen, C.-H. Real-time modulated nanoparticle separation with an ultra-large dynamic range. *Lab. Chip* **16**, 75–85 (2016).

321. Du, S. & Drazer, G. Gravity driven deterministic lateral displacement for suspended particles in a 3D obstacle array. *Sci. Rep.* **6**, (2016).

322. Bowman, T. J., Drazer, G. & Frechette, J. Inertia and scaling in deterministic lateral displacement. *Biomicrofluidics* **7**, 064111 (2013).

323. Collins, D. J., Alan, T. & Neild, A. Particle separation using virtual deterministic lateral displacement (vDLD). *Lab Chip* **14**, 1595–1603 (2014).

324. Bao, D., Beech, J. P. & Tegenfeldt, J. O. High throughput extracellular vesicle sorting using electrokinetic deterministic lateral displacement. *MicroTAS 2020 - 24th Int. Conf. Miniaturized Syst. Chem. Life Sci. Chem. Biol. Microsyst. Soc. 2020 P 637-638 MicroTAS 2020 - 24th Int. Conf. Miniaturized Syst. Chem. Life Sci.* 637–638 (2020).

325. Inglis, D. W. *et al.* Microfluidic device for label-free measurement of platelet activation. *Lab. Chip* **8**, 925 (2008).

326. Siyang Zheng, Yung, R., Yu-Chong Tai & Kasdan, H. Deterministic lateral displacement MEMS device for continuous blood cell separation. in *18th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2005. MEMS 2005.* 851–854 (2005).

327. Siyang Zheng, Yu-Chong Tai & Kasdan, H. A Micro Device for Separation of Erythrocytes and Leukocytes in Human Blood. in *2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference* 1024–1027 (2005).

328. Huang, R. *et al.* A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells (NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women. *Prenat. Diagn.* **28**, 892–899 (2008).

329. Inglis, D. W., Lord, M. & Nordon, R. E. Scaling deterministic lateral displacement arrays for high throughput and dilution-free enrichment of leukocytes. *J. Micromechanics Microengineering* **21**, 054024 (2011).

330. Zeng, Y. *et al.* Microfluidic enrichment of plasma cells improves treatment of multiple myeloma. *Mol. Oncol.* **12**, 1004–1011 (2018).

331. Civin, C. I. *et al.* Automated leukocyte processing by microfluidic deterministic lateral displacement: Automated Microfluidic Blood Leukocyte Processing. *Cytometry A* **89**, 1073–1083 (2016).

332. Zeming, K. K., Salafi, T., Chen, C.-H. & Zhang, Y. Asymmetrical Deterministic Lateral Displacement Gaps for Dual Functions of Enhanced Separation and Throughput of Red Blood Cells. *Sci. Rep.* **6**, (2016).

333. Yamada, M., Seko, W., Yanai, T., Ninomiya, K. & Seki, M. Slanted, asymmetric microfluidic lattices as size-selective sieves for continuous particle/cell sorting. *Lab. Chip* **17**, 304–314 (2017).

334. Kowalik, A., Kowalewska, M. & Góźdź, S. Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods—implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors. *Transl. Res.* **185**, 58-84.e15 (2017).

335. Khodaee, F., Movahed, S., Fatouraee, N. & Daneshmand, F. Numerical Simulation of Separation of Circulating Tumor Cells from Blood Stream in Deterministic Lateral Displacement (DLD) Microfluidic Channel. *J. Mech.* **32**, 463–471 (2016).

336. Zhou, J. *et al.* Isolation of circulating tumor cells in non-small-cell-lung-cancer patients using a multi-flow microfluidic channel. *Microsyst. Nanoeng.* **5**, (2019).

337. Liu, Z. *et al.* Integrated Microfluidic Chip for Efficient Isolation and Deformability Analysis of Circulating Tumor Cells. *Adv. Biosyst.* **2**, 1800200 (2018).

338. Holm, S. H., Beech, J. P., Barrett, M. P. & Tegenfeldt, J. O. Simplifying microfluidic separation devices towards field-detection of blood parasites. *Anal. Methods* **8**, 3291–3300 (2016).

339. Laki, A. J., Botzheim, L., Iván, K., Tamási, V. & Civera, P. Separation of Microvesicles from Serological Samples Using Deterministic Lateral Displacement Effect. *BioNanoScience* **5**, 48–54 (2015).

340. Santana, S. M., Antonyak, M. A., Cerione, R. A. & Kirby, B. J. Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from hetergeneous extracellular shed vesicle populations. *Biomed. Microdevices* **16**, 869–877 (2014).

341. Hochstetter, A. *et al.* Deterministic Lateral Displacement: Challenges and Perspectives. *ACS Nano* **14**, 10784–10795 (2020).

342. Chen, Y. *et al.* Concentrating Genomic Length DNA in a Microfabricated Array. *Phys. Rev. Lett.* **114**, (2015).

343. Wunsch, B. H. *et al.* Gel-on-a-chip: continuous, velocity-dependent DNA separation using nanoscale lateral displacement. *Lab. Chip* **19**, 1567–1578 (2019).

344. Zeming, K. K., Salafi, T., Shikha, S. & Zhang, Y. Fluorescent label-free quantitative detection of nano-sized bioparticles using a pillar array. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).

345. Osta, W. A. *et al.* EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy. *Cancer Res.* **64**, 5818–5824 (2004).

346. Chen, Z. H. *et al.* Characterizing Size and Porosity of Hollow Nanoparticles: SAXS, SANS, TEM, DLS, and Adsorption Isotherms Compared. *Langmuir* **28**, 15350–15361 (2012).

347. Gardiner, C. *et al.* Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 25361 (2014).

348. Greasley, S. L. *et al.* Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium. *J. Colloid Interface Sci.* **469**, 213–223 (2016).

349. Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 614–627 (2014).

350. Cai, C. *et al.* Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Induce Long-Lasting Immunity Against Hepatitis C Virus Which Is Blunted by Polyunsaturated Fatty Acids. *Front. Immunol.* **9**, 723 (2018).

351. Labarère, J. Cours de Biostatistiques. (Université Grenoble Alpes, 2015).

352. Serrano-Pertierra, E. *et al.* Extracellular Vesicles: Current Analytical Techniques for Detection and Quantification. *Biomolecules* **10**, 824 (2020).

353. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Membr. Viruses Immunopathol.* **175**, 720–731 (1972).

354. Yan, H., Li, Y., Cheng, S. & Zeng, Y. Advances in Analytical Technologies for Extracellular Vesicles. *Anal. Chem.* **93**, 4739–4774 (2021).

355. Xu, Y., Yang, X. & Wang, E. Review: Aptamers in microfluidic chips. *Anal. Chim. Acta* **683**, 12–20 (2010).

356. Wu, L. *et al.* Aptamer-based microfluidics for isolation, release and analysis of circulating tumor cells. *TrAC Trends Anal. Chem.* **117**, 69–77 (2019).

357. Conroy, P. J., Hearty, S., Leonard, P. & O'Kennedy, R. J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 10–26 (2009).

358. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *science* **249**, 505–510 (1990).

359. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature* **346**, 818 (1990).

360. Patel, D., Suri, A., Jiang, F., Kumar, P. & Nonin, S. Structure, recognition and adaptative binding in RNA aptamer complexes. **272**, 645–664 (1997).

361. Hermann, T. & Patel, D. Stitching together RNA tertiary architectures. *J. Mol. Biol.* **294**, 829–849 (1999).

362. Eaton, B., Gold, L. & Zichi, D. Let's get specific: the relationship between specificity and affinity. **2**, 633–638 (1995).

363. Jayasena, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**, 1628–1650 (1999).

364. Toulmé, J.-J. *et al.* Les aptamères: Du concept à l'outil. *Médecine Nucl.* **31**, 478–484 (2007).

365. McKeague, M. & DeRosa, M. C. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *J. Nucleic Acids* **2012**, 1–20 (2012).

366. Sun, H. & Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules* **20**, 11959–11980 (2015).

367. Beaucage, S. L. & Iyer, R. P. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* **48**, 2223–2311 (1992).

368. Röthlisberger, P. & Hollenstein, M. Aptamer chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **134**, 3–21 (2018).

369. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. & Yarus, M. Diversity of Oligonucleotide Functions. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763–797 (1995).

370. Ducongé, F. & Toulmé, J.-J. In vitro selection identifies key determinants for loop–loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1. *RNA* **5**, 1605–1614 (1999).

371. Pileur, F. Selective inhibitory DNA aptamers of the human RNase H1. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5776–5788 (2003).

372. Werstuck, G. & Green, M. R. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **282**, 296–298 (1998).

373. Jhaveri, S., Rajendran, M. & Ellington, A. D. In vitro selection of signaling aptamers. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1293–1297 (2000).

374. Mairal, T. *et al.* Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 989–1007 (2008).

375. Yamamoto-Fujita, R. & Kumar, P. K. R. Aptamer-Derived Nucleic Acid Oligos: Applications to Develop Nucleic Acid Chips to Analyze Proteins and Small Ligands. *Anal. Chem.* **77**, 5460–5466 (2005).

376. Wang, Z. *et al.* Screening and multiple detection of cancer exosomes using an SERS-based method. *Nanoscale* **10**, 9053–9062 (2018).

377. Chen, J., Xu, Y., Lu, Y. & Xing, W. Isolation and Visible Detection of Tumor-Derived Exosomes from Plasma. *Anal. Chem.* **90**, 14207–14215 (2018).

378. Zhang, K. *et al.* Rapid Capture and Nondestructive Release of Extracellular Vesicles Using Aptamer-Based Magnetic Isolation. *ACS Sens.* **4**, 1245–1251 (2019).

379. Jiang, Y. *et al.* Aptamer/AuNP Biosensor for Colorimetric Profiling of Exosomal Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 11916–11920 (2017).

380. Song, Z. *et al.* Development of a CD63 Aptamer for Efficient Cancer Immunochemistry and Immunoaffinity-Based Exosome Isolation. *Molecules* **25**, 5585 (2020).

381. Song, Y. *et al.* Selection of DNA Aptamers against Epithelial Cell Adhesion Molecule for Cancer Cell Imaging and Circulating Tumor Cell Capture. *Anal. Chem.* **85**, 4141–4149 (2013).

382. Keller, L., Werner, S. & Pantel, K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress* **3**, 165–180.

383. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).

384. Dundas, C. M., Demonte, D. & Park, S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9343–9353 (2013).

385. König, L. *et al.* Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *OncoImmunology* **7**, e1376153 (2018).

386. Stanciu, L., Wei, Barui & Mohammad, N. Recent Advances in Aptamer-based biosensors for Global health Applications. *Annu. Rev.* 433 (2021).

387. Liu, C. *et al.* λ-DNA- and Aptamer-Mediated Sorting and Analysis of Extracellular Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 3817–3821 (2019).

388. Gwak, H. *et al.* Microfluidic chip for rapid and selective isolation of tumor-derived extracellular vesicles for early diagnosis and metastatic risk evaluation of breast cancer. *Biosens. Bioelectron.* **192**, 113495 (2021).

389. Pariset, E. *et al.* Purification of complex samples: Implementation of a modular and reconfigurable droplet-based microfluidic platform with cascaded deterministic lateral displacement separation modules. *PLoS ONE* **13**, (2018).

390. Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J. A. & Vader, P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front. Immunol.* **9**, 738 (2018).

391. Paolini, L. *et al.* Fourier-transform Infrared (FT-IR) spectroscopy fingerprints subpopulations of extracellular vesicles of different sizes and cellular origin. *J. Extracell. Vesicles* **9**, 1741174 (2020).

392. Salmond, N., Khanna, K., Owen, G. R. & Williams, K. C. Nanoscale flow cytometry for immunophenotyping and quantitating extracellular vesicles in blood plasma. *Nanoscale* **13**, 2012–2025 (2021).

393. Li, P. *et al.* Membrane Feature-Inspired Profiling of Extracellular Vesicles for Pancreatic Cancer Diagnosis. *Anal. Chem.* **93**, 9860–9868 (2021).

394. Wunsch, B. H. *et al.* Advancements in Throughput, Lifetime, Purification, and Workflow for Integrated Nanoscale Deterministic Lateral Displacement. *Adv. Mater. Technol.* **6**, 2001083 (2021).

395. Davis, J. A. *et al.* Deterministic hydrodynamics: taking blood apart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14779–14784 (2006).

396. Bierbaum, K. *et al.* Growth of Self-Assembled n-Alkyltrichlorosilane Films on Si(100) Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **11**, 2143–2150 (1995).

397. Balachander, N. & Sukenik, C. N. Monolayer transformation by nucleophilic substitution: Applications to the creation of new monolayer assemblies. *Langmuir* **6**, 1621–1627 (1990).

398. Sugimura, H., Hozumi, A., Kameyama, T. & Takai, O. Organosilane self-assembled monolayers formed at the vapour/solid interface. *Surf. Interface Anal.* **34**, 550–554 (2002).

399. Boerio, F. J., Wagh, V. H. & Dillingham, R. G. Vapor-Phase Silanation of Plasma-Polymerized Silica-Like Films by γ-Aminopropyltriethoxysilane. *J. Adhes.* **81**, 115–142 (2005).

400. Hoang, A., Marchand, G., Nonglaton, G., Texier-Nogues, I. & Vinet, F. Surface Functionalization for Micro- and Nanosystems. *Chem. Microelectron.* 309–360 (2013).

401. https://fr.wikipedia.or /wiki/Fluide_supercritique.

402. Rull, J. *et al.* Functionalization of silicon oxide using supercritical fluid deposition of 3,4-epoxybutyltrimethoxysilane for the immobilization of amino-modified oligonucleotide. *Appl. Surf. Sci.* **354**, 285–297 (2015).

403. Hitchen, S. M. & Dean, J. R. Properties of supercritical fluids. *Appl. Supercrit. Fluids Ind. Anal.* 1–11 (1993).

404. Darpentigny, C. Nanocellulose-based materials functionalized in supercritical CO2 for antimicrobial wound dressing applications. (Université Grenoble Alpes, 2019).

405. Wang, L., Schubert, U. S. & Hoeppener, S. Surface chemical reactions on self-assembled silane based monolayers. *Chem. Soc. Rev.* 10.1039.D0CS01220C (2021).

406. Gunda, N. S. K., Singh, M., Norman, L., Kaur, K. & Mitra, S. K. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Appl. Surf. Sci.* **305**, 522–530 (2014).

407. Liu, D. *et al.* Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing. *TrAC Trends Anal. Chem.* **122**, 115701 (2020).

408. Dendane, N. *et al.* Efficient Surface Patterning of Oligonucleotides Inside a Glass Capillary through Oxime Bond Formation. *Bioconjug. Chem.* **18**, 671–676 (2007).

409. Prahlada Rao, S. & Sunkada, S. Making sense of boiling points and melting points. *Resonance* **12**, 43–57 (2007).

410. Loy, D. A., Baugher, B. M., Baugher, C. R., Schneider, D. A. & Rahimian, K. Substituent Effects on the Sol−Gel Chemistry of Organotrialkoxysilanes. *Chem. Mater.* **12**, 3624–3632 (2000).

411. Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235–1239 (2007).

412. Hassanpour Tamrin, S., Sanati Nezhad, A. & Sen, A. Label-Free Isolation of Exosomes Using Microfluidic Technologies. *ACS Nano* **15**, 17047–17079 (2021).

Annexes

Protocoles expérimentaux

1. Culture cellulaire en vue de l'isolement de vésicules extracellulaires

- *1.a. Informations générales sur la culture cellulaire :*

Milieu de cryo-conservation : FBS 10% DMSO

Cryo-conservation : Pour cellules adhérentes : 1,0x10^6 cellules/mL ; pour cellules non-adhérentes : 1,0x10^7 cellules/mL.

Milieu de culture sans EVs provenant du FBS (exo-free) :

Le milieu est supplémenté par 20% de FBS et ultracentrifugé à 100 000g pendant 18 heures à 4°C. Le surnageant est collecté, filtré sur 0,22 µm et conservé à -20°C avant utilisation.

- *1.b. Lignée cellulaire MCF-7 :*

La lignée cellulaire MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) est une lignée de cellules tumorales mammaires adhérentes.

Milieu de culture : MEM Glutamax® ; 10% FBS ; 1% PenSrep

Ensemencer entre 20 000 et 40 000 cellules/mL

Passage à 80% de confluence maximum (80 000 cellules/mL)

Volumes utilisés : Flasque T75 cm^2 = 12 mL ; Flasque T175 cm^2 = 24 mL

Le milieu de culture des cellules est changé tous les 48 à 72 h. Les cellules sont passées à 80% de confluence maximum. Les cellules sont détachées à l'aide de trypsine (0,05% ; v : v), durant 5 minutes à 37°C. Les flasques sont incubées à 37°C, 5%CO_2, 95% d'humitié.

- *1.c. Lignée cellulaire THP-1 :*

La lignée cellulaire THP-1 est une lignée de monocytes obtenue à partir de sang humain. Ce sont des cellules non-adhérentes pouvant se différencier en macrophages par stimulation.

Milieu de culture : RPMI Glutamax® ; 10% FBS ; 1% PenSrep

Ensemencer entre 200 000 et 400 000 cellules/mL

Passage à 80% de confluence maximum (800 000 cellules/mL)

Volumes utilisés : Flasque T75 cm^2 = 12 mL ; Flasque T175 cm^2 = 24 mL

Le milieu de culture des cellules est changé tous les 48 à 72 h. Les cellules sont passées à 80% de confluence maximum. Les flasques sont incubées à 37°C, 5%CO_2, 95% d'humidité.

2. Isolement de vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle

48 h avant l'isolement, les cellules sont incubées avec le milieu de culture adéquat supplémenté par du FBS (*exo-free*). Brièvement, les cellules sont rinçées deux fois avec du DPBS puis resuspendues dans le milieu *exo-free*.

La concentration en cellules avant isolement ne doit pas excéder 80% de confluence. Le processus de centrifugation différentielle consiste à retirer progressivement les cellules, les cellules mortes et les débris cellulaires du milieu de culture par des centrifugations de 10 minutes respectivement à 300, 2 000 et 10 000 g. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé à 100 000 g à 4°C pendant 2 heures (Beckman Coulter Ultracentrifuge L-90K, rotor : Ti 70, référence tubes : 355618). Le culot d'EVs est ensuite rincé au DPBS puis à nouveau ultracentrifugé à 100 000 g pendant 2 heures. Le culot final d'EVs est resuspendu dans 200 µL, aliquoté et conservé à 4°C ou -20°C en fonction de l'application.

NB : Isolement d'EVs à partir de sang total.

Les échantillons de sang humain sont collectés par l'Etablissement Français du Sang du CHU de Grenoble.

Le processus d'isolement d'EVs à partir de plasma sanguin est similaire. Le sang total est centrifugé à 2 500 g durant 15 minutes afin d'obtenir du plasma. Le plasma est dilué avec un volume équivalent en DPBS. Puis les étapes de centrifugations à 10 000 et 100 000 g sont les mêmes que décrites ci-dessus.

3. Western blot

Les échantillons d'EVs et de cellules sont lysés respectivement dans des tampons de type Laemmli et RIPA 3 minutes à 95°C. Les lysats protéiques (10 µg environ) sont ensuite séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (10 %). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée pendant 1 heure avec du PBS + 5% BSA+ 0,02% Tween 20. L'anticorps primaire d'intérêt est incubé à 4°C toute la nuit dans du tampon de blocage. La détection est ensuite réalisée par l'ajout d'un anticorps secondaire anti-espèce couplée à la HRP révelée par le système ECL.

Anticorps	Référence	Concentration	Animal hôte
Anti-CD63	BD (clone H5C6 ; 556019)	1 mg/mL	Souris
Anti-CD81	BD (clone JS-81 ; 555675)	1 mg/mL	Souris
Anti-EpCAM	CST (VU1D9 2929)	1 mg/mL	Lapin
Anti-Alix ; Anti-TSG101 ; Anti-CD9 ; Anti-HSP60 ; Anti-Actine ; Anti-Calnexine	Kit exosome panel AbCAM (ab275018)	1 mg/mL	Lapin

4. ELISA

- *4.a.Test ELISA direct commercial kit from System Biosciences :*

Pour le kit commercial ELISA SBI (ExoELISA-ULTRA CD63 Kit), se référer au protocole

- *4.b.Tests ELISA développés au laboratoire :*

Les ELISA développés au laboratoire ont été établis en utilisant des EVs provenant de cellules MCF-7 diluées à 1 : 10 après isolement par ultracentrifugation. Le test ELISA a rassemblé un total de huit anticorps différents en fonction des différentes conformations et des marqueurs de surface que nous voulions cibler.

Anticorps	Référence	Concentration	Animal hôte	Spécificité
Anti-CD63	BD (clone H5C6 ; 556019)	1 mg/mL	Souris	-
Anti-CD63	SBI (EXOAB-CD63A-1)	0,5 mg/mL	Lapin	-
Anti-CD81	BD (clone JS-81 ; 555675)	1 mg/mL	Souris	-
Anti-CD81	SBI (EXOAB-CD81A-1)	0,5 mg/mL	Lapin	-
Anti-EpCAM	CST (VU1D9 2929)	1 mg/mL	Lapin	-
Anti-PDGF	CST (3169)	1 mg/mL	Lapin	-
Anti-souris	Sigma	10 mg/mL	Chèvre	Couplé à la HRP
Anti-lapin	Sigma	10 mg/mL	Chèvre	Couplé à la HRP

Les anticorps CD63 et CD81 de System Biosciences (SBI) sont des anticorps produits chez le lapin à une concentration de 1 mg/mL et ont été utilisés à une concentration finale de 10 µg/mL. Les anticorps CD63 et CD81 de Beckton Dickinson (BD) sont des anticorps produits chez la souris, à une concentration de 0,5 mg/mL et ont été utilisés à une concentration finale de 5 µg/mL. Les anticorps anti-EpCAM (souris) et anti-PDGFR β (lapin) proviennent tous deux de Cell Signalling Technologies (CST), à une concentration de 1 mg/mL et ont été utilisés à une concentration finale de 10 µg/mL. Les anticorps secondaires qui sont anti-espèces et liés à la HRP, ont été utilisés avec une dilution finale de 1 : 5 000.

Toutes les étapes d'incubation et de lavage ont été réalisées en agitant la plaque pour que les puits soient complètement recouverts par le liquide. Qu'il s'agisse d'un format *sandwich* ou direct, la première étape consiste en l'adsorption des anticorps ou des EVs sur une plaque Maxisorp Nunc Thermo 96 puits, dilués dans 50 µL de tampon de *coating* (tampon carbonate / bicarbonate à pH = 9,6) pendant 1 heure à 37°C. Après deux étapes de lavage avec PBS + 0,01% Tween 20 suivies de deux lavages avec PBS (dans le format

direct seulement trois lavages avec PBS) pendant 5 minutes chacun, les plaques ont été bloquées avec 300 µL de PBS + 1% BSA pendant 1 heure. Toutes les étapes d'incubation suivantes ont été réalisées à température ambiante pendant 1 h sous agitation. Entre chaque étape, les plaques ont été lavées trois fois avec du PBS, 1 % BSA pendant 5 minutes sous agitation. Les puits ont ensuite été inversés en tapant sur une serviette, en prenant soin de ne pas laisser les puits se dessécher. Après l'incubation des anticorps anti-espèce-HRP, 100 µL de TMB reconstitué ont été ajoutés par puits pendant 10 minutes. Ensuite, 100 µL de tampon d'arrêt (acide sulfurique 2 M) ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été immédiatement lues sur un lecteur de microplaque TECAN à 450 nm avec une mesure à 690 nm comme référence.

NB : Traitement des données

L'analyse des données est réalisée par le logiciel Excel et sont présentés sous forme d'histogramme. Quand cela a été possible une analyse statistique a été réalisée par vérification de la différence des variances (test de Fischer) puis un test de Student (différence des moyennes). Le seuil de risque a été fixé à 1 ou 5% (α = 0,01 ou 0,05).

5. ELASA

Le test ELASA développé au laboratoire a été établi en utilisant des EVs provenant de cellules MCF-7 diluées à 1 : 2 après isolement par ultracentrifugation. Le test ELASA a rassemblé trois sondes d'acides nucléiques en fonction des différents marqueurs de surface que nous voulions cibler.

Deux aptamères ciblant les protéines CD63 ont été testés (CD63-1 faisant référence à l'aptamère décrit par Zhou *et al.* en 2016 ; CD63-2 à Song *et al.* 2020). L'aptamère EpCAM a été testé et fait référence à la sonde sélectionnée par Song *et al.* en 2013. L'anticorps anti-CD81 (BD) a été utilisé comme anticorps de détection couplé à un anticorps anti-souris HRP. Ils ont respectivement été utilisés à 5 µg/mL (dilution 1 : 500) et 2 µg/mL (dilution 1 : 5 000).

Toutes les étapes d'incubation et de lavage ont été réalisées en agitant la plaque pour que les puits soient complètement recouverts par le liquide. La première étape consiste au greffage de streptavidine une plaque Maxisorp Nunc Thermo 96 puits, diluée dans 50 µL de tampon de *coating* (tampon carbonate/ bicarbonate ; pH = 9,6) à laisser sécher à 37°C. Les sondes aptamères biotinylées sont diluées à 0,5 µM dans le tampon adéquat et incubées à 90°C durant 3 minutes, une rampe de température de 90 à 25°C est ensuite réalisée. Les aptamères sont greffés en sonde de capture durant 20 minutes à 25°C. Après trois étapes de lavage, une étape de blocage avec 1% de BSA est réalisée durant 1 heure. L'incubation des EVs est réalisée à 37°C durant une nuit. Les incubations des anticorps de détection sont réalisées à 25°C durant 10 minutes. Des étapes de rinçage sont effectuées avec l'ajout du TMB. Ce dernier est ajouté et la lecture du signal d'absorbance à 605 nm est réalisée au lecteur microplaque TECAN après 30 minutes de réaction.

NB : Traitement des données

L'analyse des données est réalisée de la même façon que pour les tests ELISA.

6. Isolement de sous-populations de vésicules extracellulaires par le système DLD micro-ciblé de tri en taille et biomarqueur-spécifique

L'aptamère biotinylé est dilué dans 140 µL à 2 µM dans du PBS + $MgCl_2$ (1, 2 ou 5 mM selon l'aptamère utilisé). La solution est chauffée durant 3 minutes à 90°C puis une rampe décroissante de température est

réalisée durant 30 minutes jusqu'à 25°C. Le couplage des aptamères est réalisé dans une solution de billes à 5 mg/mL à 2 µM sous agitation durant 10 minutes. L'excès d'aptamères est retiré par trois lavages successives des billes après centrifugation à 2 000 g durant 3 minutes avec du tampon de lavage (PBS + 400 mM de NaCl + 0,05% Tween 20). Les billes sont ensuite saturées avec une solution de PBS + 5% BSA durant 30 minutes sous agitation et les étapes de lavages sont réitérées.

Les EVs issues des cellules MCF-7 sont isolées par le protocole classique d'UC. Ces EVs sont diluées au 1 : 2 dans un échantillon de plasma, lui-même préalablement dilué au 1 : 10.

L'échantillon biologique est incubé (200 µL) avec la solution de billes fonctionnalisées par les aptamères durant une nuit à 37°C sous agitation. Le mélange complexe est dilué jusqu'à 1 000 µL dans le tampon adéquat et est ensuite injecté dans le système DLD micro-ciblé à 800 mbars. Le tri est réalisé en 1h30 environ. L'échantillon collecté dans la sortie déviée (100 µL environ) est incubé avec une solution contenant le brin complémentaire à l'aptamère de choix à 0,5 µM dans 200 µL dans le tampon d'hybridation durant 10 minutes à température ambiante sous agitation. La solution est ensuite centrifugée à 2 000 g durant 5 minutes afin d'isoler les billes précipitées du surnageant contenant les EVs relarguées. Les EVs d'intérêt isolées sont ensuite analysées par NTA.

7. Isolement de vésicules extracellulaires par le système DLD nano-ciblé D_c = 350 nm

48 h avant l'isolement, les cellules sont incubées avec le milieu de culture adéquat supplémenté par du FBS (*exo-free*). Brièvement, les cellules sont rinçées deux fois avec du DPBS puis resuspendues dans le milieu *exo-free*.

La concentration en cellules avant isolement ne doit pas excéder 80% de confluence. Deux flasques (75 cm^2, 2 x 12 mL) sont collectées et le milieu est centrifugé à 300 g durant 10 minutes. Le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé à 2 000 g durant 10 minutes. Le surnageant est concentré sur filtre Amicon® Ultra-15K 100K et filtré à 1,2 µm.

L'échantillon contenant les débris cellulaires et les EVs est injecté dans le système DLD D_c = 350 nm à 2 bars pour le remplissage et la pression est ensuite montée à 4 bars pour le reste de l'expérience. L'isolement des EVs est réalisé en environ 6 heures et permet de collecter environ 1 mL dans chaque sortie non-déviée et 100 µL dans la sortie déviée.

NB : Isolement d'EVs à partir de sang total.

Les échantillons de sang humain sont collectés par l'Etablissement Français du Sang du CHU de Grenoble.

Le processus d'isolement d'EVs à partir de plasma sanguin est similaire. Le sang total est centrifugé à 2 500 g durant 15 minutes afin d'obtenir du plasma. Le plasma est dilué avec un volume équivalent en DPBS. Puis les étapes sont les mêmes que décrites ci-dessus.

8. Préparation des échantillons en vue de l'observation en cryo-microscopie électronique

Les échantillons ont été déposés sur une grille de microscopie électronique préalablement nettoyée au plasma (Solarus, Gatan) recouverte d'un film de carbone (S166-3, Ted Pella) par dépôts de 1,5 µL d'échantillon. La vitrification automatisée a été assurée par un instrument Vitrobot (FEI Company) pour effectuer la cryofixation à une température contrôlée de 20,5°C, une humidité relative de 100 %, des conditions de blotting et de congélation. L'excès d'échantillon a été éliminé à l'aide d'un papier filtre avec

les paramètres de blotting suivants : temps de blot : 0,5 s, force relative : -2, temps de drainage : 0. Les grilles ont ensuite été plongées dans l'éthane liquide en équilibre avec l'éthane solide à environ - 185°C. Les grilles ont été stockées dans l'azote liquide avant d'être montées dans un cryo-portoir Gatan 626 pour l'imagerie avec un microscope électronique à transmission FEI Tecnai Osiris fonctionnant à 200 kV. Les images ont été enregistrées sur une caméra US1000XP (Gatan) avec 2048 x 2048 pixels.

9. Caractérisation des vésicules extracellulaires par Nanoparticles Tracking Analysis

Equipement : Nanosight NS300 Malvern avec un laser à 488 nm

Logiciel : Nanosight NTA 3.1

Concentration idéale : environ 50 particules/image (acceptable si supérieure à 10-15 particules/image)

L'échantillon à analyser est dilué dans un DPBS préalablement filtré sur 0,22 µm. La dilution est calculée de façon à obtenir une concentration d'environ 50 particules/image dans un volume d'environ 500-700 µL. Les échantillons d'EVs isolées par UC sont typiquement diluées environ 1 000 fois avant analyse par NTA. Le pousse seringue est réglé afin d'avoir un débit de 20 µL/min. Le focus et le niveau de la caméra sont ajustés en fonction du type de particule observé. L'analyse est réalisée durant trois fois 60s. Les données sont ensuite traitées et le seuil de détection est choisi. Ce seuil de détection correspond au nombre de pixels minimum pour être considéré comme une particule.

Fabrication des composants DLD au CEA Leti

Les composants DLD silicium sont conçus et fabriqués au CEA Leti. Disposant de plateformes pour la microélectronique de pointe, les composants sont préparés au sein d'une salle blanche avec des équipements de haute technologie. Les composants DLD sont réalisés sur des *wafers* de silicium 200 mm puis les *wafers* sont découpés afin d'obtenir les différents types de composants DLD. Les étapes de fabrication sont relativement longues (environ 40 à 50 étapes) et la **production dure environ 4 à 6 mois. Les étapes majeures de fabrication sont résumées ci-dessous.**

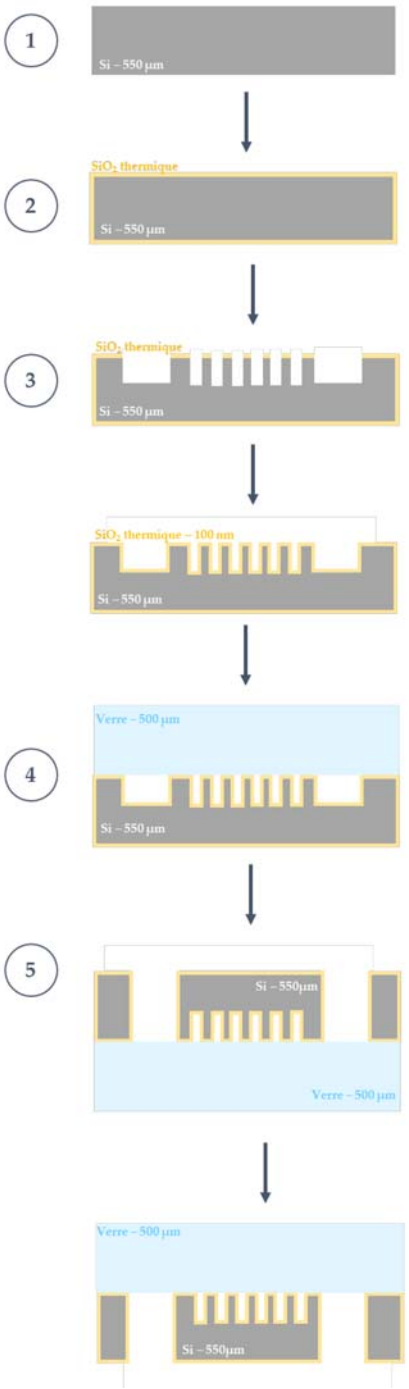
- **Etape 1 : Wafers Silicium 200 mm – épaisseur 550 µm**

- **Etape 2 : Oxydation thermique 1050°C – 1 µm**

- **Etape 3 : Structuration du canal DLD**
  - Lithographie DUV - Résine de 820 nm d'épaisseur (M78Y)
  - Gravure SiO_2 (Gravure sèche)
  - Retrait de la résine restante (Stripping sec et humide)
  - Gravure profonde de Si (30 µm) (Gravure Bosch)
  - Mesure de la profondeur de gravure (interférométrie)
  - Elimination des polymères de gravure (Gravure sèche et humide : DLD micro-ciblé : HF phase liquide ; DLD nano-ciblé : HF phase vapeur)

- **Etape 4 : Collage anodique avec des substrats verre**
  - Nettoyage de surface
  - Oxydation thermique de surface 950°C sous O_2- épaisseur 100 nm
  - Collage anodique 400°C, sous vide (substrats en verre 500 µm d'épaisseur)

- **Etape 5 : Structuration des entrées/sorties des canaux**
  - Lithographie – Résine de 12 µm d'épaisseur (THB820)
  - Gravure profonde sèche de Si (520 µm)
  - Retrait de la résine (Stripping sec)



Liste des publications

Articles scientifiques et *proceedings*

M. Gaillard, F. Boizot, C. Raillon, V. Agache, A. Thuaire and Y. Roupioz, *Isolation of extracellular vesicles subpopulations by combination of capture by aptamer-coated bead microcarriers with microfluidic size sorting*, Proceeding from MicroTAS 2021 conference.

N. Sarrut-Rio, M. Gaillard, F. Boizot, P. Laurent, M. Cubizolles and A. Thuaire, *Integration of DLD modules on a microfluidic platform for the fractionation of viral particles*, Proceeding from MicroTAS 2021 conference.

M. Gaillard, N. Sarrut-Rio, L. Virot, C. Pudda, F. Boizot, N. Verplanck, C. Raillon, V. Agache, Y. Roupioz and A. Thuaire, *Deterministic lateral displacement for the sorting of extracellular vesicles from complex biological samples*, Proceeding from MicroTAS 2020 conference.

M. Gaillard, A. Thuaire, G. Nonglation, V. Agache, Y. Roupioz and C. Raillon, *Biosensing extracellular vesicles: contribution of biomolecules in affinity-based methods for detection and isolation*, Analyst, 2020.

Conférences internationales

MicroTAS'21, octobre 2021, Palm Springs (USA) et conférence virtuelle, présentation de poster, *Isolation of extracellular vesicles subpopulations by combination of capture by aptamer-coated bead microcarriers with microfluidic size sorting*.

Workshop Nanoandes, novembre 2021, Pérou et conférence virtuelle, présentation orale, *Development of a DLD-based microfluidic device for bio-targeted sorting of extracellular vesicles*.

MicroTAS'20, octobre 2020, conférence virtuelle, présentation de poster, *Deterministic lateral displacement for the sorting of extracellular vesicles from complex biological samples*.

Conférences nationales

Conférence FSEV, septembre 2021, La Grande Motte, présentation orale, *Development of a DLD-based microfluidic device for bio-targeted sorting of extracellular vesicles*.

GDR Micro-Nanofluidique, septembre 2021, Toulouse, présentation de poster, *Isolation of extracellular vesicles subpopulations by combination of capture by aptamer-coated bead microcarriers with microfluidic size sorting*.

Scientific Days – Labex ARCANE, juin 2021, Grenoble, présentation orale, *Développement d'un dispositif microfluidique de tri bio-ciblé de vésicules extracellulaires*.

Journée de la chimie, mars 2019, Grenoble, présentation de poster, *Aptamer engineering in DLD microfluidic cell sorting for early detection of extracellular vesicles*.

Développement d'un système microfluidique de tri en taille et biomarqueur-spécifique pour l'analyse de vésicules extracellulaires

Dans le cadre de l'amélioration des procédés d'analyse de biologie médicale et particulièrement des méthodes de diagnostic, les vésicules extracellulaires apparaissent comme des biomarqueurs avec un fort potentiel depuis une dizaine d'années. En effet, elles portent la signature protéique de leurs cellules émettrices, ce qui peut être exploité comme outil de diagnostic. Cependant, la communauté scientifique fait face à un manque d'outils technologiques pour l'isolement de ces biomarqueurs au vu de l'hétérogénéité de l'échantillon nanométrique. Ces limites freinent l'utilisation de ces nouveaux types de biomarqueurs en diagnostic clinique. Ainsi, de nouvelles méthodes sont requises pour effectuer un isolement efficace, simple et rapide des vésicules extracellulaires à partir d'une biopsie liquide. Le développement d'un système utilisant des nouvelles technologies à la frontière des domaines de la microfluidique et de la biochimie s'inscrit dans cette évolution. La technique microfluidique de tri en taille de Déplacement Latéral Déterministe (DLD) apparaît comme une des technologies prometteuses pour le tri passif d'objets biologiques. L'association tri en taille et biomarqueur-spécifique est alors permise par la combinaison d'un système DLD couplé à des aptamères ciblant les protéines biomarqueurs d'intérêt. Les possibilités de capture spécifique des vésicules extracellulaires par les aptamères ont été étudiées comme sondes alternatives aux anticorps *via* la mise en place d'une nouvelle méthode de détection. En parallèle, le développement d'un système microfluidique DLD pour l'isolement des vésicules extracellulaires à partir de milieux biologiques complexes comme alternative aux méthodes conventionnelles a été réalisé. L'intégration du tri DLD biomarqueur-spécifique à l'aide d'aptamères a été abordée de façon à proposer un système microfluidique complet d'analyse de vésicules extracellulaires à partir de liquide biologique.

Development of a size sorting and biomarker-specific microfluidic system for the analysis of extracellular vesicles

In the context of the improvement of medical biology analysis processes and particularly of diagnostic methods, extracellular vesicles appear as biomarkers with a strong potential since about ten years. They indeed carry the protein signature of their emitting cells, which can be exploited as a diagnostic tool. However, the scientific community is facing a lack of technological tools for these biomarkers isolation due to the heterogeneity of the sample of nanometric-scale particles. These limitations hinder the use of these new types of biomarkers in clinical diagnosis. Thus, new methods are required to perform efficient, simple and rapid isolation of extracellular vesicles from liquid biopsy.

The development of a system using new technologies at the frontier of the fields of microfluidics and biochemistry is part of this evolution. The microfluidic technique of Deterministic Lateral Displacement (DLD) size sorting appears to be one of the promising technologies for the passive sorting of biological objects. The combination of size sorting and biomarker-specific sorting is then enabled by the combination of a DLD system coupled to aptamers targeting biomarker proteins of interest. The possibilities of specific capture of extracellular vesicles by aptamers have been studied as alternative probes to antibodies by setting up a new detection method. In parallel, the development of a DLD-based microfluidic system for the isolation of extracellular vesicles from complex biological media as an alternative to conventional methods has been performed. The integration of biomarker-specific DLD sorting using aptamers has been addressed in order to propose a complete microfluidic system for the analysis of extracellular vesicles from biofluids.